

Aus dem Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung  
der Philipps-Universität Marburg  
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. R. Müller

**Die Regulation von *BM11*, *FOXO1* und *FOXO3a*  
durch den Transkriptionsfaktor E2F-1**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie der



vorgelegt von

**Katrin Nowak**

aus Görlitz

Marburg an der Lahn, September 2007

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität als Dissertation am 29.10.2007  
angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl

Zweitgutachter: Prof. Dr. Martin Eilers

Tag der mündlichen Prüfung: 9.11.2007

Wesentliche Teile der vorliegenden Arbeit wurden in folgenden Artikeln veröffentlicht:

- Katrin Nowak, Kornelius Kerl, Daniel Fehr, Christoph Kramps, Christine Gessner, Katrin Killmer, Birgit Samans, Bernd Berwanger, Holger Christiansen and Werner Lutz: *BMII* is a target gene of E2F-1 and is strongly expressed in primary neuroblastomas. *Nucleic Acids Research* (2006), Vol. 34, 6, 1745-1754
- Katrin Nowak, Katrin Killmer, Christine Gessner and Werner Lutz: E2F-1 regulates expression of FOXO1 and FOXO3a. *Biochimica et Biophysica Acta* (2007), 1769, 244-252

<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Die Charakteristik von Tumoren</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Apoptose, Zellzyklus und Seneszenz</b>	<b>3</b>
<b>1.3 Die E2F-Transkriptionsfaktoren</b>	<b>6</b>
1.3.1 Die aktivierenden E2Fs: E2F-1, E2F-2 und E2F-3a	8
1.3.2 Die reprimierenden E2Fs: E2F-3b, E2F-4 und E2F-5	10
1.3.3 E2F-6, E2F-7 und E2F-8	11
1.3.4 Die Regulation der E2Fs durch die Pocketproteine	12
1.3.5 E2F-1 als Onkogen, Tumorsuppressor und in der Tumorgenese	13
1.3.6 Signalwege von E2F-1 zur Induktion von Apoptose	15
1.3.7 Die Einteilung von E2F-Zielgenen entsprechend ihrer Regulation im Zellzyklus	16
<b>1.4 Der Transkriptionsfaktor BMI1</b>	<b>18</b>
1.4.1 Die Strukturelemente von BMI1 und ihre Funktionen	18
1.4.2 Die Polycomb-Komplexe und die Rolle von BMI1	20
1.4.3 Die Rolle von BMI1 in der Entwicklung	22
1.4.4 Der Einfluss von BMI1 auf die Proliferation und die Selbsterneuerung von Stammzellen	23
1.4.5 BMI1 in Tumoren	24
1.4.6 Die Regulation von BMI1	25
<b>1.5 Die FOXO-Transkriptionsfaktoren</b>	<b>27</b>
1.5.1 Die Eigenschaften und Funktionen der Untergruppe O der Forkhead-Transkriptionsfaktoren	27
1.5.2 Die Strukturelemente der FOXOs	28
1.5.3 Die Regulation der FOXOs auf posttranslationaler Ebene	30
1.5.4 Die FOXO-vermittelte Regulation der Proliferation	32
1.5.5 Die FOXO-induzierte Apoptose	33
1.5.6 Die Verbindung von E2F-1 und den FOXOs in der Apoptose	34
1.5.7 Weitere Funktionen der FOXO-Transkriptionsfaktoren	35
<b>1.6 Zielsetzung</b>	<b>37</b>

<b>2 MATERIALIEN</b>	<b>38</b>
<b>2.1 Zelllinien, verwendete Medien und Antibiotika</b>	<b>38</b>
2.1.1 Säugerzelllinien	38
2.1.2 Für die Zelllinien verwendete Medien und Antibiotika	40
<b>2.2 DNA</b>	<b>41</b>
2.2.1 Primer	41
2.2.2 DNA-Oligonukleotide	43
2.2.3 Plasmide	43
<b>2.3 Antikörper</b>	<b>48</b>
2.3.1 Primäre Antikörper	48
2.3.2 Sekundäre Antikörper	49
<b>2.4 Chemikalien</b>	<b>49</b>
<b>2.5 Puffer, Lösungen und Medien</b>	<b>50</b>
<b>2.6 Lysate aus primären Neuroblastomen</b>	<b>55</b>
<b>2.7 Gebrauchsmaterialien</b>	<b>55</b>
<b>2.8 Geräte, Membranen und Filme</b>	<b>55</b>
<b>3 METHODEN</b>	<b>57</b>
<b>3.1 Molekularbiologische Methoden</b>	<b>57</b>
3.1.1 Transformation von kompetenten Bakterien mit Plasmid-DNA und Plasmidamplifikation	57
3.1.2 Isolation der Plasmid-DNA aus Bakterien	57
3.1.3 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten	58
3.1.4 DNA-Extraktion aus Agarosegel	58
3.1.5 Sequenz-spezifische Hydrolyse von DNA (Restriktionsverdau)	59
3.1.6. Hybridisieren von zwei DNA-Einzelsträngen	59
3.1.7 Ligation	60
3.1.8 RNA-Isolation	60
3.1.9 cDNA-Synthese	61
3.1.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	62
3.1.11 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA	64

3.1.12 cDNA-Microarray .....	64
3.2 Zellbiologische Methoden .....	64
3.2.1 Auftauen von Zellen .....	64
3.2.2 Passagieren von Zellen und Serumentzug .....	65
3.2.3 Einfrieren von Zellen .....	65
3.2.4 Transfektion von Plasmid-DNA in Säugerzellen .....	66
3.2.5 Retrovirale Infektion .....	67
3.2.6 Differenzierung von PC12-Zellen mit NGF- $\beta$ und Entzug von NGF- $\beta$ ..	69
3.2.7 Färbung von seneszenten Zellen .....	69
3.2.8 Giemsa-Färbung von Zellen .....	70
3.2.9 Propidiumiodid-Durchflusszytometrie .....	70
3.3 Proteinbiochemische Methoden .....	71
3.3.1 Herstellen von Proteinlysaten für den Western Blot .....	71
3.3.2 Isolierung von Chromatin-assoziierten Proteinen .....	71
3.3.3 Proteinbestimmung nach Bradford .....	72
3.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	72
3.3.5 Western Blot .....	73
3.3.6 Bestimmung der Luziferase-Aktivität (Luziferase-Assay) .....	73
3.3.7 Bestimmung der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität ( $\beta$ -Gal-Assay) .....	74
4 ERGEBNISSE .....	75
4.1 Die verwendeten, induzierbaren Zelllinien .....	75
4.2 Die Regulation von <i>BMII</i> durch E2F-1 und die Rolle von BMI1 für die E2F-1-Funktion .....	77
4.2.1 Die Induktion der <i>BMII</i> -mRNA und die Erhöhung der BMI1-Proteinmenge in verschiedenen Zelllinien .....	78
4.2.2 E2F-1-induziertes BMI1 ist im Zellkern lokalisiert .....	82
4.2.3 Die Chromatinassoziation von E2F-1-induziertem BMI1 .....	83
4.2.4 „Loss-of-Function“-Systeme von BMI1 und ihre Auswirkungen .....	84
4.2.5 Die Regulation von <i>BMII</i> während des Zellzyklus .....	91
4.2.6 Die Veränderung der E2F-1-Aktivität hat keine Wirkung auf die <i>BMII</i> -Expression .....	95
4.2.7 Hohe BMI1-Mengen in humanen, primären Neuroblastomen .....	97

4.2.8 Die Rolle von BMI1 in der Seneszenz.....	99
4.3 Die Regulation der <i>FOXOs</i> durch E2F-1 und ihre Rolle in der E2F-1-induzierten Apoptose.....	104
4.3.1 Die Regulation der <i>FOXOs</i> durch E2F-1 in verschiedenen Zelllinien ..	104
4.3.2 Die Aktivierung von <i>FOXO1</i> durch Bindung von E2F-1 an den <i>FOXO1</i> -Promotor .....	106
4.3.3 Die Induktion von <i>FOXOs</i> durch physiologische E2F-1-Aktivität.....	108
4.3.4 Die Regulation der <i>FOXOs</i> ist für die E2F-1-induzierte, neuronale Apoptose nicht essentiell.....	110
5 DISKUSSION .....	117
5.1 Die Funktion der Regulation von BMI1 durch E2F-1 .....	117
5.1.1 Die Auswirkungen der Stimulation von E2F-1-ER und physiologischer E2F-1-Aktivität .....	117
5.1.2 Die Wirkung der Induktion von BMI1 durch E2F-1 auf seine Proteinmenge und in verschiedenen Organismen .....	119
5.1.3 E2F-1-induziertes BMI1 ist im Nukleus lokalisiert und an Chromatin assoziiert.....	120
5.1.4 Die Ursachen der Probleme bei der Etablierung eines „Loss-of-function“-Systems für BMI1 .....	121
5.1.5 <i>BMI1</i> wird nicht beim Wiedereintritt in den Zellzyklus induziert .....	124
5.1.6 Die Rolle von BMI1 in Tumoren und speziell in primären Neuroblastomen .....	126
5.1.7 Die Rolle von BMI1 während der Seneszenz.....	128
5.1.8 Die biologische Relevanz der Induktion von BMI1 durch E2F-1.....	129
5.2 Die Charakterisierung und Einordnung der Regulation von FOXO1 und FOXO3a durch E2F-1 .....	132
5.2.1 Die Spezifität der Induktion der <i>FOXOs</i> durch E2F-1.....	132
5.2.2 Der Einfluss von E2F-1 und verschiedenen E2F-1-Mutanten auf den proximalen <i>FOXO1</i> -Promotor .....	133
5.2.3 Die Rolle von FOXO1 und FOXO3a bei der Induktion der Apoptose durch E2F-1 .....	135

<b>5.3 Ausblick: Die Rolle der Regulationen von <i>FOXOs</i> und <i>BMI1</i> für andere Funktionen von E2F-1 .....</b>	<b>138</b>
<b>6 ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>141</b>
<b>7 LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>142</b>
<b>8 ANHANG .....</b>	<b>163</b>
<b>8.1 Abkürzungen .....</b>	<b>163</b>
<b>8.2 Übersicht der verwendeten Protein- und Genschreibweisen .....</b>	<b>168</b>
<b>8.3 Ergebnisliste des cDNA-Microarrays von 1A3-Zellen .....</b>	<b>169</b>
<b>8.4 Lebenslauf .....</b>	<b>176</b>
<b>8.5 Danksagung .....</b>	<b>177</b>
<b>8.6 Ehrenwörtliche Erklärung .....</b>	<b>178</b>

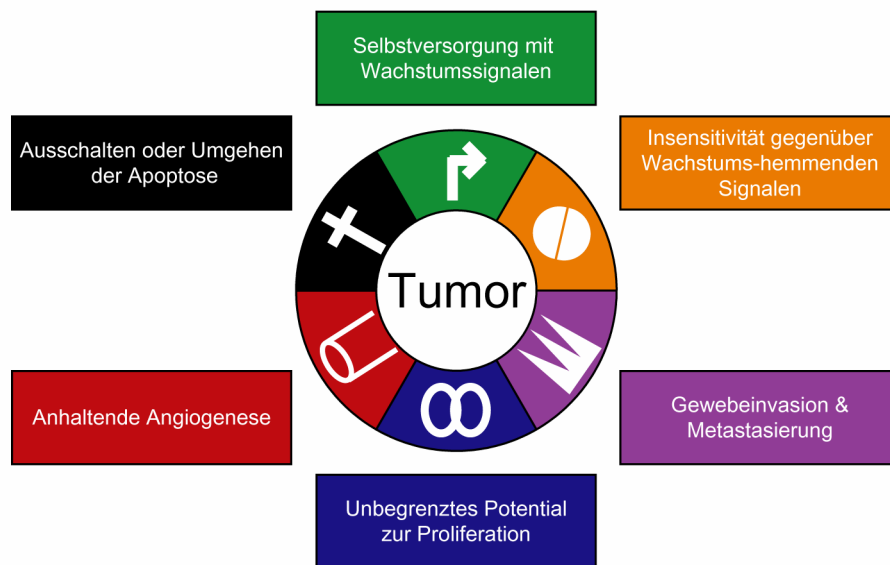


# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Die Charakteristik von Tumoren

Krebs stellt neben Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland dar. Jährlich erkranken in Deutschland ca. 400.000 Menschen, wobei das mittlere Erkrankungsalter bei 69 Jahren liegt (Bertz et al., 2006). Dies und die altersspezifische Inzidenz in Deutschland zeigen, dass mit zunehmendem Alter Veränderungen im Körper auftreten, die eine Tumorbildung begünstigen können (Bertz et al., 2006). Es ist bekannt, dass die Entwicklung eines Tumors auf genetischen Defekten beruht. Sowohl durch verschiedene äußere Einflüsse als auch spontan können genetische Veränderungen sogenannter Tumorgene auftreten. Tumorgene werden in zwei Klassen mit entgegengesetzter Bedeutung eingeteilt: Onkogene und Tumorsuppressorgene (Kulozik et al., 2000). Durch qualitative Veränderungen von Onkogenen, wie zum Beispiel Punktmutationen oder Rekombinationen, entstehen strukturell defekte Genprodukte mit eigenständigen, biologischen Eigenschaften. Zur Bildung größerer oder geringerer Mengen von Proteinen kommt es durch quantitative Veränderungen eines Onkogens, wie Amplifikationen oder Störungen der epigenetischen Modifikationen. Onkogene werden als dominant bezeichnet, da es bereits zu einer Fehlregulation kommt, wenn nur ein Allel ein tumorigenes Protein kodiert (Kulozik et al., 2000). Lange Zeit wurde dagegen angenommen, dass Tumorsuppressorgene rezessiv sind und es demzufolge den Verlust beider Allele bedarf, bis biologisch relevante Funktionen deutlich werden (Knudson, Jr., 1971; Comings, 1973). Durch Untersuchungen von Mäusen, die heterozygot für ein Gen waren, wurde jedoch deutlich, dass für manche Tumorsuppressorgene eine Haploinsuffizienz besteht (Fero et al., 1998; Venkatachalam et al., 1998). Dabei reicht ein Allel nicht aus, um die volle Funktionalität zu erhalten, die normalerweise von zwei Wildtyp-Allelen übernommen wird. Durch den Verlust von einem intakten Allel, während gleichzeitig das zweite Allel in seiner Funktion nicht beeinträchtigt wird, ist die Prädisposition für Tumore im Vergleich zur Wildtyp-Situation bereits deutlich erhöht. In einem Übersichtsartikel wurden die Phänotypen der 39 bis dahin gefundenen, haploinsuffizienten Tumorsuppressorgene zusammengefasst (Payne and Kemp, 2005).

Um eine neoplastische Transformation, die Umwandlung einer Körperzelle in eine Tumorzelle, zu bewirken, müssen mehrere Tumorgene genetisch verändert werden. Bei Nagetieren sind mindestens zwei, beim Menschen meistens mindestens drei Veränderungen im Genom notwendig, um eine Zelle zu transformieren (Hahn et al., 1999). Das maligne (bösartige) Wachstum wird nur möglich, wenn durch diese genetischen Veränderungen sechs Aspekte der Zellphysiologie modifiziert werden (Hanahan and Weinberg, 2000) (Abbildung 1).



**Abbildung 1: Die sechs Kennzeichen eines Tumors.** Diese Fähigkeiten müssen Körperzellen erlangen, damit aus ihnen ein Tumor entstehen kann. (Abbildung modifiziert nach (Hanahan and Weinberg, 2000)).

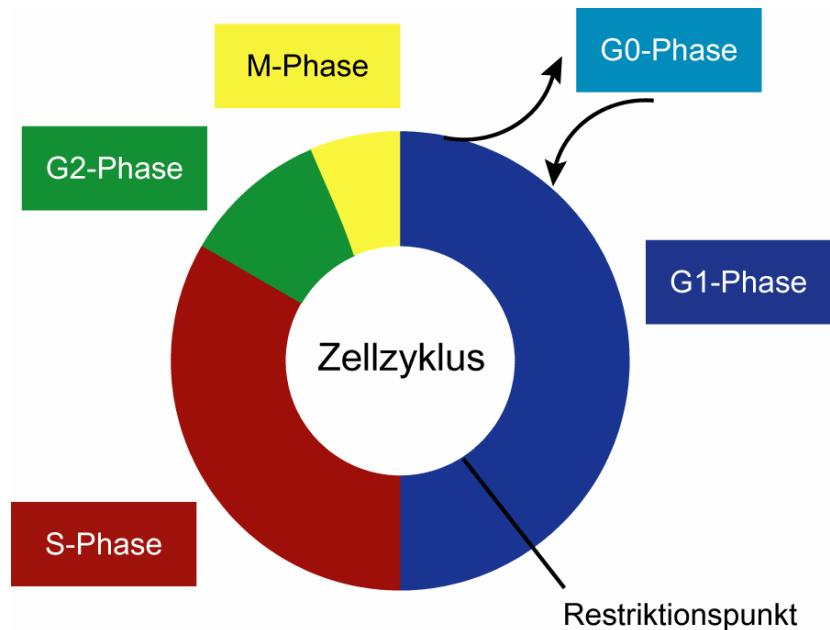
Dazu gehört die Selbstversorgung mit Wachstumssignalen genauso wie die Insensitivität gegenüber Wachstums-hemmenden Signalen. Ein weiterer Punkt ist das Umgehen oder Ausschalten des programmierten Zelltods, der so genannten Apoptose. Für das unbegrenzte Wachstum eines Tumors ist ein uneingeschränktes Potential zur Replikation ebenso notwendig wie die anhaltende Angiogenese. Außerdem besitzt ein Tumor die Fähigkeit, anderes Gewebe zu infiltrieren und Metastasen zu bilden. Jeder dieser Punkte stellt einen Hinderungsgrund für die Entstehung und das Wachstum eines Tumors dar und einen Ansatz für die Therapie von Tumoren.

## 1.2 Apoptose, Zellzyklus und Seneszenz

Die Reaktivierung der Apoptose wird besonders intensiv als mögliche Therapiestrategie diskutiert. Der von einer Tumorzelle am häufigsten, genutzte Weg zum Vermeiden von Apoptose besteht in der Mutation des Tumorsuppressorgens *TP53* (tumor protein 53). Die funktionelle Inaktivierung von p53 kommt in mehr als 50% der menschlichen Tumore vor, denn p53 induziert nicht nur wichtige pro-apoptotische Zielgene sondern auch Gene, die zum Zellzyklusarrest oder zur Seneszenz führen können. Eine gezielte Reaktivierung der Apoptose in Tumorzellen durch zum Beispiel das Einbringen von funktionellem p53 würde das spezifische Sterben dieser Zellen zur Folge haben (Martins et al., 2006). Dann bliebe im Vergleich zur Strahlen- oder Chemotherapie auch das gesunde Gewebe unbeschädigt. Dies ist jedoch nur ein Ansatz von vielen, die derzeit im Rahmen von Forschungen zur Identifizierung neuer Tumortherapien verfolgt werden. Neben der Mutation von *TP53* treten in allen Tumoren etliche andere genetische Veränderungen auf, die die Bösartigkeit des jeweiligen Tumors mit bestimmen können.

Unter Zellzyklus wird der zyklische Verlauf von Ereignissen in einer eukaryotischen Zelle von einer Teilung bis zur nächsten verstanden. Der Zellzyklus ist aufgeteilt in die Mitose-(M-) und in die Interphase, die wiederum aus G1 (Gap1)-, S (Synthese)- und G2 (Gap2)-Phase besteht (Abbildung 2). Da die während des Zellzyklus stattfindende Replikation der DNA und Zellteilung anfällig für genetische Veränderungen und somit Entartungen sind, gibt es einen so genannten Restriktionspunkt sowie mehrere andere Checkpoints (Kontrollpunkte). An diesen Kontrollpunkten im Zellzyklus kann dieser gestoppt und die Zellen können arretiert werden. Aufgetretene Zellschäden werden dann entweder repariert oder bei zu schwerwiegenden wird die Apoptose der Zellen eingeleitet. Der als Restriktionspunkt bezeichnete Checkpoint ist in der späten G1-Phase bevor in der S-Phase die Replikation der DNA erfolgt (Abbildung 2). In der G1-Phase, die auch postmitotische Phase genannt wird, wächst die Zelle, Zellbestandteile werden gebildet und durch die Produktion von mRNA für Histone und Replikationsenzyme wird die Synthesephase vorbereitet. Bei Abweichungen kann die Zelle beim Übergang von der G1- zur S-Phase festgehalten werden. Sie ist dann im G1/S-Arrest. Liegen keine Fehler in der Zelle vor oder wurden diese nicht erkannt, beginnt die Zelle unweigerlich mit der Replikation und Produktion von Histonen. Da dies dann nicht mehr aufgehalten

werden kann und die Zelle unabhängig von Wachstumsfaktoren geworden ist, wird der Restriktionspunkt auch oft als Punkt ohne Umkehr („point of no return“) bezeichnet (Piatti et al., 1996).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung des Zellzyklus.** Der Zellzyklus kann in die G1-, S-, G2- und M-Phase unterteilt werden. G1-, S- und G2-Phase bilden die so genannte Interphase, die zwischen zwei Mitosephasen liegt. Zellen können den Zellzyklus verlassen und in die als G0 bezeichnete Ruhephase eintreten. Durch verschiedene Stimuli ist ein Wiedereintritt in den Zellzyklus möglich, solange das proliferative Potential nicht erschöpft ist.

Anschließend beginnt mit der G2-Phase die prämitotische Phase, die sich durch Wachstum und Abrunden der Zelle äußert. Außerdem werden zellteilungsspezifische Proteine und RNA-Moleküle synthetisiert. In der späten G2-Phase gibt es einen Checkpoint, an dem die korrekte und vollständige Replikation kontrolliert wird. Das Festhalten der Zelle an diesem Kontrollpunkt aufgrund von Schäden oder Fehlern, wird als G2/M-Arrest bezeichnet. Nach dem Überschreiten dieses Checkpoints erfolgt die Zellteilung in der M-Phase. In der Mitose-Phase gibt es weitere Kontrollpunkte, an denen der korrekte Aufbau des Zellspindelapparates (spindle assembly checkpoint) und die Aufteilung der Chromosomen auf die Tochterzellen (segregation checkpoint) überprüft werden. Der ungestörte Ablauf des Zellzyklus ist besonders für Tumorzellen essentiell, da der Tumor ansonsten nicht proliferieren kann. Deshalb werden oft Tumorsuppressorgene mutiert, die einen Zellzyklusarrest bewirken können.

Ist das proliferative Potential einer Zelle erschöpft, verlässt sie den Zellzyklus und geht in eine Ruhephase, die als G0 (Gap0)-Phase bezeichnet wird. Sie ist dann noch

metabolisch aktiv, jedoch kann sie durch mitogene Stimulierung nicht mehr in den Zellzyklus zurückkehren. Dieser irreversible Prozess ist eine Form der Seneszenz und ist durch eine erhöhte Expression von Zellzyklusinhibitoren, wie zum Beispiel *INK4A*, gekennzeichnet. Die Zelle wächst weiter, teilt sich aber nicht mehr, wodurch die große, flache Morphologie erklärt werden kann. Zellen, die noch proliferieren können, aber deren Umgebung die Zellteilung negativ beeinflusst, gehen ebenfalls in die G0-Phase des Zellzyklus. Des Weiteren befinden sich fast alle differenzierten Zellen in der G0-Phase. Diese Zellen können durch zum Beispiel mitogene Stimulierung wieder in den Zellzyklus eintreten. Dieser vorübergehende, reversible Arrest in der G0-Phase wird als Quieszenz bezeichnet. Die Zellen verlangsamen dabei ihren Metabolismus, die RNA- und Proteinsynthese wird reduziert und das Wachstum gehemmt. Dadurch sind quieszente Zellen anhand ihrer Morphologie und der Expression vieler Gene von seneszenten Zellen zu unterscheiden (Coller et al., 2006; Zhang et al., 2003). Die replikative Seneszenz als Anhalten der Proliferation stellt ebenfalls einen für den Tumor gefährlichen Mechanismus dar, der vom ihm überwunden und von uns zur Therapie genutzt werden sollte.

### 1.3 Die E2F-Transkriptionsfaktoren

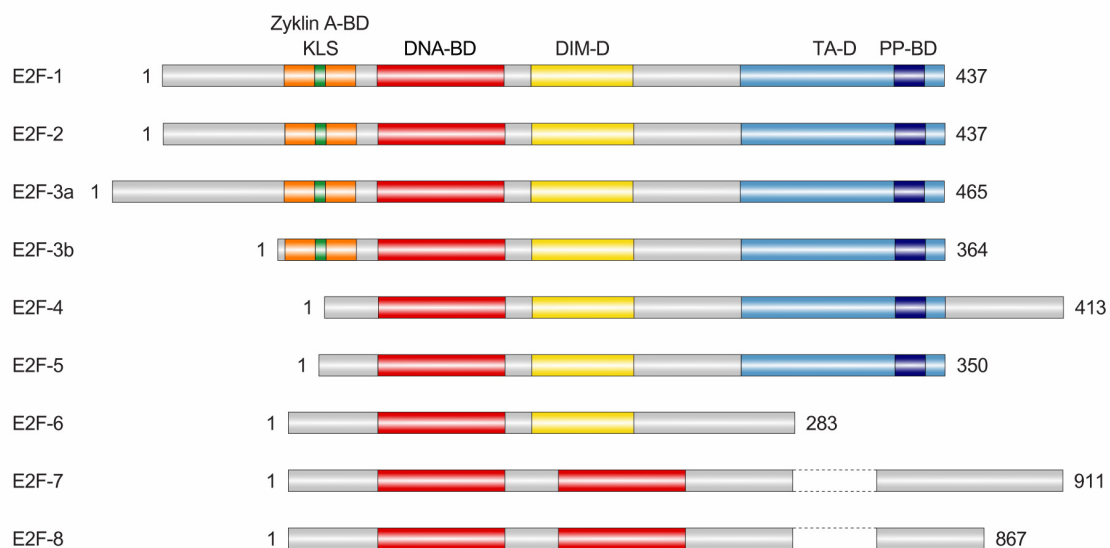
Die E2F-Transkriptionsfaktoren umfassen 9 Mitglieder, die durch eine konservierte Helix-Loop-Helix-DNA-Bindungsdomäne charakterisiert sind (Abbildung 3). Das erste E2F (**E2** promotor binding factor) wurde ursprünglich aufgrund seiner Bindung zum adenoviralen E2-Promotor identifiziert (Kovesdi et al., 1986). Nachdem E2F aus Kernextrakten von HeLa-Zellen isoliert wurde, konnte nachgewiesen werden, dass E2F die Transkription des viralen E2-Promotors stimuliert (Kovesdi et al., 1987). Dies wurde durch die Anwesenheit des E1A-Proteins (**E**arly region **1A**) begünstigt. Nachdem ein E2F/pRB-Komplex identifiziert wurde, konnte auch die Ursache dieser Wirkung von E1A erklärt werden. Durch seine Bindung zum pRB (**R**etinoblastoma **P**rotein, Retinoblastomprotein) löst E1A den E2F/pRB-Komplex auf und E2F wird somit freigesetzt (Chellappan et al., 1991). Erst dann resultiert die Bindung von E2F an die konservierte E2F-Bindungsstelle (TT)-T-C/G-C/G-C-G-C/G auch in einer Aktivierung des Zielgenpromotors. Daraus wurde erkenntlich, dass die Interaktion von pRB mit E2F zumindestens dessen Fähigkeit zur transkriptionalen Aktivierung inhibiert (Hiebert et al., 1992). Parallel dazu wurde E2F von einer anderen Arbeitsgruppe als Sequenz-spezifischer Transkriptionsfaktor DRTF1 (**d**ifferentiation-**r**egulated **t**ranscription **f**actor **1**) identifiziert, der in einem Komplex mit pRB vorkommen kann (Bandara and La Thangue, 1991; Shivji and La Thangue, 1991).

Das erste Tumorsuppressorgen, das kloniert wurde, war *RB* (Lee et al., 1987). Nachdem die pRB-verwandten Proteine p107 und p130 identifiziert wurden, konnte eine Komplexbildung von diesen Proteinen mit speziellen E2Fs nachgewiesen werden (Ewen et al., 1991; Hannon et al., 1993). Dabei hat diese Assoziation stets eine Repression von E2F-Zielgenen zur Folge. Aufgrund von zwei konservierten Domänen, die miteinander interagieren und eine Art Tasche (engl. pocket) formen, werden pRB, p107 und p130 auch als Pocketproteine bezeichnet.

pRB ist außerdem in der Lage repressorische Komplexe zu E2F-Zielgenpromotoren zu rekrutieren. Dadurch interagiert E2F mit vielen verschiedenen Komponenten und die Regulation der Transkription wird komplexer und ist vom jeweiligen zellulären Programm abhängig. So wurde der so genannte dREAM-Komplex (*Drosophila* **R**BF, **E**2F, and **M**yb-interacting proteins) in *Drosophila melanogaster* identifiziert, der E2F-

Zielgene reprimiert, die eine Rolle in der Differenzierung spielen (Korenjak et al., 2004).

Zur E2F-Familie gehören neben den E2F-Transkriptionsfaktoren ihre Dimerisierungspartner. DP-1 (**D**RTF1-**P**olypeptid-**1**) wurde durch seine Assoziation mit E2F-1 bzw. DRTF1 identifiziert (Girling et al., 1993). Die Heterodimerisierung und gemeinsame DNA-Bindung resultiert in einer synergistischen Transaktivierung von Zielgenen und wird durch Dimerisierungsdomänen möglich (Bandara et al., 1993; Krek et al., 1993). Zwei weitere DP-Proteine, DP-2 (DP-3 in der Maus) und DP-4, wurden identifiziert, die ebenfalls mit E2Fs DNA binden können (Zhang and Chellappan, 1995; Milton et al., 2006). Während der Komplex mit DP-2 aktivierend wirkt, zeichnen sich E2F/DP-4 Komplexe durch verringerte DNA-Bindungsaffinität aus. Außerdem interferiert DP-4 mit der Transaktivierung durch E2F-1 und verzögert den Zellzyklus (Milton et al., 2006). E2F-7 und E2F-8 besitzen keine Dimerisierungsdomäne und bilden dementsprechend kein Heterodimer mit den DPs (Logan et al., 2004; Logan et al., 2005) (Abbildung 3).



**Abbildung 3: Schematische Darstellung der Proteinstrukturen der E2F-Transkriptionsfaktoren.** Die verschiedenen E2Fs sind durch eine konservierte DNA-Bindungsdomäne (DNA-BD), die in E2F-7 und E2F-8 dupliziert vorliegt, gekennzeichnet. E2F-1 bis E2F-6 können über ihre Dimerisierungsdomäne (DIM-D) mit den DP-Proteinen ein Heterodimer bilden. Im C-Terminus von E2F-1 bis E2F-5 liegt die Transaktivierungsdomäne (TA-D), in der sich die Bindungsdomäne für die Pocketproteine (PP-BD) befindet. Die Anzahl der Aminosäuren ist jeweils am Ende der Struktur dargestellt. Orange: Zyklin A-Bindungsdomäne (Zyklin A-BD). Grün: Kernlokalisationssignal (KLS). Rot: DNA-BD. Gelb: DIM-D. Hellblau: TA-D. Dunkelblau: PP-BD. (Abbildung modifiziert nach (Rowland and Bernards, 2006; DeGregori and Johnson, 2006).

Zur Aktivierung ihrer Zielgene sind die C-terminalen Transaktivierungsdomänen (TA-D) der E2Fs essentiell. Durch die Abwesenheit dieser Domäne in E2F-6, E2F-7 und E2F-8 wird die Sonderstellung dieser E2Fs deutlich. Diese drei E2F-Proteine besitzen keine Pockettprotein-Bindungsstelle, die bei den anderen E2Fs in der TA-D liegt. Aufgrund solcher struktureller und somit funktioneller Unterschiede konnten die E2F-Transkriptionsfaktoren in Gruppen eingeteilt werden. Mit der Zeit stellte sich heraus, dass diese Einteilung zwar sehr vereinfacht ist, jedoch wird sie zur Veranschaulichung der vielfältigen Funktionen der E2Fs gern verwendet.

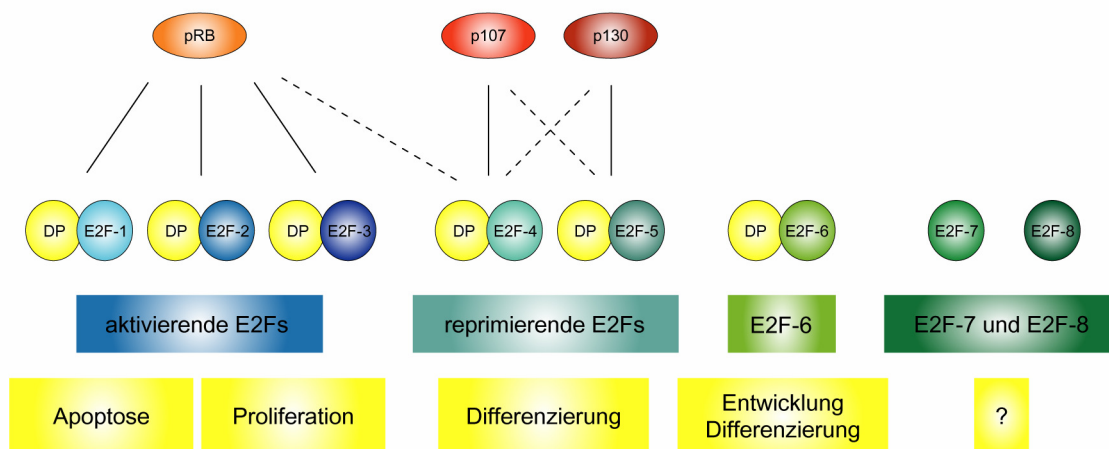
### **1.3.1 Die aktivierenden E2Fs: E2F-1, E2F-2 und E2F-3a**

E2F-1 war das erste Mitglied der E2F-Transkriptionsfaktoren, das identifiziert wurde (Kovesdi et al., 1986). Die Gene für E2F-2 und E2F-3 wurden aufgrund von Sequenzhomologien zu E2F-1 isoliert (Ivey-Hoyle et al., 1993; Lees et al., 1993). Erst später wurde entdeckt, dass ausgehend vom *E2F-3*-Lokus der Maus zwei Transkripte entstehen (Leone et al., 2000). Das längere Transkript kodiert für das ursprüngliche E2F-3 und wurde daraufhin als E2F-3a bezeichnet (Abbildung 3). Der Promotor des kürzeren Transkripts liegt im ersten Intron von E2F-3a, woraufhin ein N-terminal verkürztes E2F-3b, entsteht. Neben den gemeinsamen DNA-Bindungs-, Dimerisierungs- und Transaktivierungsdomänen besitzen E2F-1, E2F-2, E2F-3a und E2F-3b noch eine Bindungsstelle für Zyklin A. Dieses konservierte Motiv ermöglicht die stabile Bindung des Zyklin A/CDK2-Komplexes, der dann das E2F/DP-Dimer phosphorylieren kann (Krek et al., 1994; Dynlacht et al., 1994; Kitagawa et al., 1995). Dadurch wird die Affinität zur DNA-Bindung herabgesetzt und Zielgene können nicht aktiviert werden (Xu et al., 1994).

Trotz dieser Gemeinsamkeiten wird E2F-3b meist, aufgrund seiner Funktion bei der transkriptionellen Repression von Zielgenen, zu den reprimierenden E2Fs gezählt (Leone et al., 2000; Trimarchi and Lees, 2002). Durch die aktivierenden E2Fs kann ebenfalls eine Repression von Zielgenen über die pRB-Rekrutierung stattfinden (Abbildung 4). So erfolgt die Regulation der aktivierenden E2Fs bzw. ihrer Funktion in der frühen G1-Phase des Zellzyklus und bei Arrestbedingungen. Eine Interaktion zwischen den aktivierenden E2Fs und p107 oder p130 wurde noch nicht beobachtet. Bei E2F-1, E2F-2 und E2F-3a überwiegt die Aktivierung von Genen, die wichtig für die



Proliferation und die Apoptose sind. Ihre Funktionsweise wird durch die verstärkte Expression der aktivierenden E2Fs in der späten G1- und frühen S-Phase des Zellzyklus unterstrichen. Dadurch kommt es zum Beispiel zur Aktivierung und Erhöhung von Zyklin E, das für den Übergang von der G1- zur S-Phase des Zellzyklus notwendig ist (Duronio and O'Farrell, 1995). Auch die Zykline des Typs A und D gehören zu den Proteinen, deren Gene durch die E2Fs aktiviert werden. Eine Überexpression aktivierender E2Fs kann außerdem bewirken, dass Zellen, die sich in der G0-Phase im Ruhezustand befinden, wieder in den Zellzyklus eintreten. Besonders deutlich wird das proliferative Potential der aktivierenden E2Fs bei der Transformation von primären Zellen. So werden bei Expression von *E2f-1* und *Dp-1* primäre Zellen transformiert, aus denen nach Transplantation in Nacktmäuse dann Tumore entstehen können (Johnson et al., 1994). Der Verlust der aktivierenden E2Fs in Mäusen zeigt ebenfalls ihre Rolle in der Proliferation und besonders im Zellzyklus, da MEFs (murine embryonic fibroblasts, Mausembryofibroblasten) ohne die drei E2Fs im Zellzyklus arretieren und nicht mehr proliferieren (Wu et al., 2001).



**Abbildung 4: Übersicht über die Interaktionen der E2Fs mit Pocket- und DP-Proteinen sowie biologische Funktionen der E2Fs.** Die aktivierenden E2Fs interagieren mit pRB, während p107 für E2F-4 und p130 für E2F-5 die vorrangigen Bindungspartner sind. Obwohl sich einige Zielgene der aktivierenden und reprimierenden E2Fs überlappen, sind die hauptsächlichsten biologischen Funktionen nicht identisch. (Abbildung modifiziert nach (Attwooll et al., 2004).

Neben dieser positiven Wirkung auf die Proliferation ist besonders die Induktion der Apoptose durch die E2Fs hervorzuheben. Dabei wird kontrovers diskutiert, ob ausschließlich E2F-1 verantwortlich ist oder auch E2F-3a eine Rolle spielt. Die Überexpression von *E2F-1* allein führt zur Apoptose und bei der durch ektopische

Expression von *E2F-3a* ausgelösten Apoptose wurde eine Anreicherung von E2F-1 beobachtet (DeGregori et al., 1997; Lazzerini and Helin, 2005). Es konnte ferner gezeigt werden, dass die sogenannte „marked-box domain“ im C-Terminus von E2F-1 essentiell für die Induktion der Apoptose ist (Hallstrom and Nevins, 2003). Diese Domäne ist in E2F-3 nicht konserviert, was als Ursache angesehen wurde, weshalb E2F-3 allein keine Apoptose induzieren konnte. Jedoch konnte eine andere Arbeitsgruppe zeigen, dass die Induktion von allen drei aktivierenden E2Fs unter bestimmten Bedingungen in der Apoptose der Zellen resultiert (Vigo et al., 1999). Genauso komplex wie die Frage des Apoptose-induzierenden E2F sind die Signalwege, die dabei beteiligt sind (siehe 1.3.6).

### **1.3.2 Die reprimierenden E2Fs: E2F-3b, E2F-4 und E2F-5**

Im Vergleich zu den aktivierenden werden die reprimierenden E2Fs konstitutiv exprimiert und liegen meistens assoziiert mit Pocketproteinen vor. E2F-3b bildet einen Komplex mit pRB, während E2F-4 bevorzugt mit p107 und E2F-5 mit p130 interagiert (Leone et al., 2000; Beijersbergen et al., 1994; Ginsberg et al., 1994; Hijmans et al., 1995) (Abbildung 4). Jedoch kann E2F-4 auch mit pRB und p130 und E2F-5 mit p107 abhängig vom Proliferationsstatus und von der Art der Zellen einen Komplex bilden (Vairo et al., 1995; Moberg et al., 1996; Gaubatz et al., 2000). Der Bindung aller E2Fs mit den Pocketproteinen ist gemeinsam, dass durch Phosphorylierung der Pocketproteine eine Dissoziation von den E2Fs erfolgt (Chellappan et al., 1991) (siehe 1.3.4). Erst hyperphosphoryliertes Pocketprotein löst sich von den E2Fs, was für E2F-4 und E2F-5 eine Translokation in das Zytoplasma zur Folge hat. Im Vergleich zu den aktivierenden liegen die reprimierenden E2Fs zytoplasmatisch und nicht nukleär vor (Gaubatz et al., 2001). Ursache dafür ist das Fehlen eines KLS (nuclear localization signal, **K**ernlokalisationssignal) aufgrund des verkürzten N-Terminus der reprimierenden E2Fs. Außerdem besitzen E2F-4 und E2F-5 KES (nuclear export signal, **K**ernexportsignal), die ihre Ausschleusung aus dem Zellkern nach der Phosphorylierung und Dissoziation der Pocketproteine unterstützen. So hat nur eine Assoziation mit hypophosphorylierten Pocketproteinen eine Translokation in den Zellkern zur Folge, womit eine aktivierende Wirkung von E2F-4 und E2F-5 auf Zielgene ausgeschlossen wird. Zusätzlich rekrutieren die E2F/DP/Pocketprotein-Komplexe HDACs (**h**istone

**de**acetylases, Histondeacetylasen), die die Acetylreste von Histonen entfernen. Neben Histondeacetylasen konnten weitere Enzymaktivitäten in reprimierenden E2F/DP/Pocketprotein-Komplexen nachgewiesen werden (Robertson et al., 2000; Vandel et al., 2001).

Die Funktion der reprimierenden E2Fs liegt hauptsächlich in der Repression der E2F-Zielgene. Dadurch können Zellen aus dem Zellzyklus austreten und die zur Proliferation entgegengesetzt verlaufende, terminale Differenzierung wird ermöglicht (Gaubatz et al., 2000; Persengiev et al., 1999). Es ist jedoch anzumerken, dass die Zielgene von aktivierenden und reprimierenden E2Fs zwar überlappen, aber nicht identisch sind (DeGregori and Johnson, 2006). So können pro-apoptotische Zielgene durch aktivierende E2Fs bzw. E2F-1 zwar induziert, jedoch durch reprimierende E2Fs nicht inhibiert werden (Giovanni et al., 2000; Moroni et al., 2001; Cao et al., 2004; Hershko and Ginsberg, 2004). Auch zeigt der Verlust von E2F-4 und E2F-5, dass sie im Gegensatz zu den aktivierenden E2Fs keine Rolle in der Proliferation spielen (Lindeman et al., 1998; Humbert et al., 2000). Dagegen besteht die biologische Funktion von E2F-4 und E2F-5 in der Differenzierung von Zellen (Lindeman et al., 1998; Humbert et al., 2000; Rempel et al., 2000).

### **1.3.3 E2F-6, E2F-7 und E2F-8**

Diese drei zuletzt identifizierten E2Fs unterscheiden sich von den anderen in vielerlei Hinsicht. Am auffälligsten ist das Fehlen der Transaktivierungsdomäne und damit auch der Bindungsstelle für Pocketproteine (Abbildung 3). Dennoch ist ihre grundlegende Wirkung eine Repression von Zielgenen über Pocketprotein-unabhängige Wege. Das nukleär lokalisierte E2F-6 kann über seine Dimerisierungsdomäne ebenfalls mit DP-Proteinen ein Heterodimer bilden und an DNA binden (Cartwright et al., 1998). Jedoch resultiert dies nicht in einer Aktivierung sondern einer Inhibierung der Transkription von Promotoren mit E2F-Bindungsstellen. Die dafür notwendige und hinreichende, reprimierende Domäne von E2F-6 befindet sich im C-Terminus des Proteins (Gaubatz et al., 1998). Interessant ist, dass die Expression von *E2F-6* durch die aktivierenden E2Fs induziert werden kann (Lyons et al., 2006). Dies stellt möglicherweise einen negativen „Feedback“-Mechanismus für die Regulation des Zellzyklus dar. Durch *E2f-6*-defiziente Mäuse konnte gezeigt werden, dass E2F-6 für die Entwicklung und

Differenzierung von Bedeutung ist (Storre et al., 2002). *E2f-6*<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigten zum Beispiel Veränderungen des Skeletts und einen Defekt in der Entwicklung der Spermatozyten. Weitere Analysen dieses E2Fs sind nötig, um seine präzise Rolle in den zellulären Prozessen zu bestimmen.

E2F-7 und E2F-8 fehlen die Dimerisierungsdomäne und sie besitzen eine zweite, separate DNA-Bindungsdomäne (Logan et al., 2004; Logan et al., 2005) (Abbildung 3). Die jeweils zwei DNA-Bindungsdomänen können miteinander interagieren, so dass sich wahrscheinlich ein Homodimer bildet, welches dem E2F/DP-Heterodimer ähnelt. Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch intramolekulare Interaktionen der zwei DNA-Bindungsdomänen stattfinden (Logan et al., 2004). E2F-7 und E2F-8 wirken, wie E2F-6, als Repressoren auf E2F-Zielgene, in dem sie zum Beispiel die Zellzyklusprogression verlangsamen. Als Ursache ihrer Wirkung konnte jedoch nicht wie bei E2F-6 eine reprimierende Domäne identifiziert werden. Vielmehr erfolgt durch E2F-7 und E2F-8 eine Beeinträchtigung der aktivierenden E2Fs (Logan et al., 2004; Logan et al., 2005). Zum momentanen Zeitpunkt gibt es noch keine detaillierten Untersuchungen, die die Funktionen von E2F-7 und E2F-8 für die Zelle verdeutlichen.

#### **1.3.4 Die Regulation der E2Fs durch die Pocketproteine**

*RB* wurde als Tumorsuppressorgen identifiziert, welches bei Kindern mit Retinoblastom inaktiviert vorlag (Friend et al., 1986; Lee et al., 1987). Eine *RB*-Mutation ist für die Tumorprädisposition von großer Bedeutung, da pRB für die Inhibierung der ungehinderten Proliferation von Zellen durch Repression der E2Fs verantwortlich ist. Wie und wann diese Hemmung erfolgt, hängt unter anderem vom Zustand der Zellen und vom Zelltyp ab und ist immer noch Grundlage vieler Untersuchungen. Deshalb soll hier anhand der Regulation der E2Fs durch Pocketproteine zu Beginn des Zellzyklus der vereinfachte pRB-Signalweg erklärt werden.

In der G1-Phase des Zellzyklus binden unphosphorylierte Pocketproteine zunächst an die E2Fs, womit es zur Repression von E2F-Zielgenen kommt. E2F-Zielgene von Zellen in der G0-Phase werden größtenteils von Komplexen aus E2F-4 oder E2F-5 und p130 gebunden und reprimiert. Sobald ausreichend Wachstumsfaktoren oder andere Mitogene vorhanden sind, erfolgt eine Aktivierung von Signalwegen. Daraufhin kommt es zur Bildung von Zyklinen des Typs D (Genbezeichnung *CCND*), die die kataly-

tischen Komponenten für CDK4 und CDK6 (cyclin-dependent kinase, Zyklin-abhängigen Kinase) sind. Durch Zyklin D/CDK4/6-Komplexe werden die Pocketproteine phosphoryliert und dissoziieren in Folge dessen von den E2Fs ab. Für die reprimierenden E2Fs resultiert dies in der Translokalisierung in das Zytoplasma, während die aktivierenden E2Fs im Zellkern frei werden. Die Aktivierung von ersten E2F-Zielgenen wie zum Beispiel Zyklone des Typs E (Genbezeichnung *CCNE*) beginnt. Diese Zyklone bilden in der späten G1-Phase aktive Komplexe mit der Zyklin-abhängigen Kinase CDK2. Diese Komplexe phosphorylieren ebenfalls Pocketproteine, was die Freisetzung von mehr aktivierenden E2Fs zur Folge hat. Außerdem wird die Expression der aktivierenden E2Fs in der späten G1-Phase erhöht, so dass es zum sprunghaften Anstieg der Zyklin E/CDK2-Komplexe kommt. Dadurch kann die Zelle von der Mitogen-abhängigen Inaktivierung der Pocketproteine auf eine Mitogen-unabhängige Inaktivierung durch Zyklin E/CDK2-Komplexe umschalten. Der Restriktionspunkt in der späten G1-Phase wird damit überschritten und die Zellen gehen in die S-Phase des Zellzyklus, in der ihre DNA repliziert wird. Treten Fehler oder Schädigungen der Zellen oder ihrer DNA auf, kann der Zellzyklus an diesem Restriktionspunkt noch angehalten werden. Dabei können CKIs (Cyclin-dependent kinase inhibitors, Zyklin-abhängige Kinase-Inhibitoren) die Komplexe aus Zyklonen und CDKs hemmen. Ein solcher Inhibitor ist  $p16^{INK4A}$ , das ein Produkt des *INK4A/ARF*-Lokus darstellt. Durch kompetitive Verdrängung der Typ D Zyklone kann  $p16^{INK4A}$  spezifisch CDK4 und CDK6 inhibieren. Dann wird die initiale Phosphorylierung der Pocketproteine verhindert und die Zellen sind im G1/S-Arrest des Zellzyklus.

Neben Mutationen von *RB* bietet daher die Inaktivierung von  $p16^{INK4A}$  Tumorzellen ebenfalls einen Ansatzpunkt, um die ungehinderte Teilung von Zellen und damit Proliferation zu ermöglichen. Tatsächlich wird das  $p16$ -Gen, *INK4A*, im Vergleich zu *TP53*, ähnlich häufig in Tumoren des Menschen genetisch verändert. Besonders oft treten Veränderungen des *INK4A*-Gens in Pankreaskarzinomen und Glioblastomen auf.

### 1.3.5 E2F-1 als Onkogen, Tumorsuppressor und in der Tumorgenese

Die stetige Teilung der Zellen ist für die Proliferation von Tumoren essentiell. Aufgrund dessen zeigen Tumore oft Mutationen, die letztendlich zu einer Fehlregulation der E2Fs

und damit zum ungehinderten Ablauf des Zellzyklus führen. Dabei stehen statt der E2Fs selbst meist die Pocketproteine und deren Regulatoren im Mittelpunkt. Dies kann zum einen durch die positive Regulation der Differenzierung durch pRB, die damit ebenfalls unterbunden wird, begründet werden. Außerdem würde eine Überexpression oder Amplifikation von *E2F-1* durch seine Apoptose-induzierende Fähigkeit eine Gefahr für den Tumor darstellen. So tritt neben den bereits erwähnten Mutationen von *RB* und *INK4A* zum Beispiel oft eine Amplifikation des *CDK4*-Gens auf. Dadurch wird die Phosphorylierung von pRB erhöht und mehr aktivierende E2Fs werden freigesetzt. Darüber hinaus wurde das für Zyklin D1 kodierende Gen, *BCL-1*, ursprünglich entdeckt, da chromosomale Translokationen in B-Zell-Lymphomen und -Leukämien besonders diesen Genbereich betrafen (Tsujimoto et al., 1984). Diese Veränderungen führen letztendlich alle zu einer Fehlregulation und verstärkten Aktivierung der E2Fs. Da *E2F-1* ein Onkogen ist, begünstigt dies die Tumorbildung. Der Beweis dafür ist die bereits erwähnte Tumorbildung in Nacktmäusen bei ektopischer Expression von *E2f-1* und *Dp-1* (Johnson et al., 1994). Ferner wurde nach Überexpression von *E2f-1* in der Haut von Mäusen, die Bildung von Hauttumoren, und in der Leber, die Entstehung von Leberzelladenomen beobachtet (Pierce et al., 1998; Conner et al., 2000). Außerdem kann *E2f-1* in Kooperation mit aktiviertem *Ras*, das ein bekanntes und gut beschriebenes Onkogen darstellt, embryonale Fibroblasten aus der Ratte transformieren (Johnson et al., 1994). Jedoch muss erwähnt werden, dass eine Fehlregulation von E2Fs allein nicht zur Tumorentstehung ausreicht. Dafür müssen noch zusätzliche Signalwege unterbunden werden, um dem möglichen Arrest in der G2-Phase im Zellzyklus oder der Apoptose zu entgehen. Dagegen unterstreicht der Verlust von E2F-1 in verschiedenen Mausmodellen die Rolle von E2F-1 als Tumorsuppressor. So kommt es aufgrund einer defekten Apoptose von Thymozyten in *E2f-1*-defizienten Mäusen zum Überschuss an reifen T-Zellen (Field et al., 1996). Außerdem kann sich ein breites, aussergewöhnliches Spektrum an Tumoren in *E2f-1*<sup>-/-</sup>-Mäusen entwickeln (Yamasaki et al., 1996). Die Bildung von Schilddrüsentumoren in *Rb*<sup>+/-</sup>-Mäusen wird durch die *E2f-1*-Defizienz jedoch gehemmt und das Überleben dieser Tiere verlängert (Yamasaki et al., 1998). So kann E2F-1 je nach Mausmodell, Zelltyp und anderen Faktoren Funktionen einnehmen, die es als Tumorsuppressor oder Onkogen charakterisieren.

### 1.3.6 Signalwege von E2F-1 zur Induktion von Apoptose

Neben der Förderung der Proliferation ist dereguliertes E2F-1 aber auch in der Lage, Apoptose zu induzieren. Dies kann über p53-abhängige und -unabhängige Signalwege erfolgen und die transkriptionale Aktivierung pro-apoptotischer Zielgene durch E2F-1 ist dabei essentiell. Zunächst legten Untersuchungen nahe, dass für die p53-abhängige Apoptose durch E2F-1 die Induktion von p14<sup>ARF</sup> (Alternative Reading Frame, p19<sup>ARF</sup> in der Maus) nötig ist (Bates et al., 1998). p14<sup>ARF</sup> wird wie p16<sup>INK4A</sup> vom *INK4A/ARF*-Lokus kodiert und hat mit p16<sup>INK4A</sup> Exon 2 gemeinsam, während verschiedene Exons 1 zur Transkription genutzt werden. p14<sup>ARF</sup> stabilisiert p53, in dem es den negativen Regulator von p53 Hdm2 hemmt (besser bekannt als Mdm2 in der Maus, mouse double minute). Da E2F-1 die Expression von *ARF* aktiviert, wurde vermutet, dass dies die Verbindung zu p53 darstellt (Bates et al., 1998; Komori et al., 2005). Inzwischen wurde jedoch festgestellt, dass es durch E2F-1 *ARF*-unabhängig zur p53-Phosphorylierung und -Aktivierung kommen kann. Somit ist p14<sup>ARF</sup> für die Aktivierung von p53 durch E2F-1 zur Induktion der Apoptose nicht nötig (Tolbert et al., 2002; Tsai et al., 2002; Russell et al., 2002; Lindstrom and Wiman, 2003). Durch die transkriptionale Aktivierung von vielen pro-apoptotischen Zielgenen durch p53 kommt es letztendlich zur Apoptose.

Neben diesem Signalweg von E2F-1 zur Apoptose über p53 gibt es noch mehrere p53-unabhängige Wege. Zum einen induziert E2F-1 das p53-verwandte Protein p73, das ebenfalls ein Aktivator der Apoptose ist (Irwin et al., 2000). So ist die Aktivierung der Apoptose durch E2F-1 in *Tp53*-defizienten MEFs von p73 abhängig (Irwin et al., 2000). Zusätzlich kann E2F-1 durch Inhibierung der Aktivierung von anti-apoptotischen Signalen wie NF-κB die Apoptose begünstigen (Phillips et al., 1999). Transgene Mäuse, in denen E2F-1 und DP-1 überexprimiert wurden, zeigten infolge der induzierten Apoptose testikuläre Atrophie (Holmberg et al., 1998). Dieser Phänotyp veränderte sich nicht, wenn die Tiere kein funktionelles p53 besaßen. Weitere Hinweise einer E2F-1-induzierten, p53-unabhängigen Apoptose sind die vielen pro-apoptotischen Zielgene von E2F-1. Zum Beispiel aktiviert E2F-1 die Expression des Gens für APAF-1 (apoptosis protease-activating factor 1), das einen wichtigen Faktor in der Apoptose darstellt (Moroni et al., 2001). Die Freisetzung von Cytochrom c zu Beginn der Apoptose wird durch Proteine der BH3-Domänen-Familie gesteuert. E2F ist dabei durch die Aktivierung der BH3-Domänen-Proteine BIM (Bcl-2-interacting mediator of cell death) und BID involviert (Cao et al., 2004; Biswas et al., 2005). E2F-1 induziert

außerdem die Expression der Kaspasen 3, 7 und 8, die wichtige Proteasen in der Apoptose darstellen (Muller et al., 2001; Cao et al., 2004). Kaspase 3 aktiviert zum Beispiel durch Spaltung eines Inhibitors eine Desoxyribonuklease, worauf die genomische DNA abgebaut wird. Damit gibt es etliche p53-unabhängige Möglichkeiten für E2F-1 Apoptose zu induzieren. Wann durch E2F-1 der eine oder andere Signalweg genutzt wird, konnte bisher noch nicht geklärt werden.

### **1.3.7 Die Einteilung von E2F-Zielgenen entsprechend ihrer Regulation im Zellzyklus**

In den vergangenen Jahren stieg die Zahl von E2F-Zielgenen durch großangelegte Untersuchungen immens. Es kann davon ausgegangen werden, dass es Hunderte von E2F-Zielgenen gibt, die anhand ihrer Funktion den folgenden zellulären Prozessen zugeordnet werden können: Zellzyklus, DNA-Synthese und Replikation, negative Regulatoren des Zellzyklus, Kontrollpunkte, DNA-Schadensreparatur, Apoptose, Entwicklung und Differenzierung (Bracken et al., 2004). Neben dieser Einteilung nach ihrer Funktion können die E2F-Zielgene auch entsprechend ihrer Regulation im Zellzyklus klassifiziert werden. Da in der G1-Phase des Zellzyklus die aktivierenden E2Fs freigesetzt werden und ihre Zielgene stimulieren können, liegt es nahe, dass dann die Expression dieser ansteigt. Diese Art der Zellzyklus-abhängigen Regulation kann bei den Zyklinen beobachtet werden (Henglein et al., 1994; Ohtani et al., 1995). Da diese Proteine wichtige Funktionen in bestimmten Phasen des Zellzyklus ausüben, ist ihre Phasen-spezifische Regulation die Voraussetzung dafür. Die Expression von *HSCDC6* (*Homo sapiens CDC6*, humanes Ortholog von *CDC6* in *Saccharomyces cerevisiae*), dessen Produkt die Initiation der DNA-Replikation reguliert, ist abhängig vom Zellzyklus reguliert (Ohtani et al., 1998). Deutlich wird dabei, dass alle Proteine, deren Gene Zellzyklus-abhängig exprimiert werden, Funktionen in bestimmten Phasen des Zellzyklus innehaben.

Doch trifft diese Regulationsweise auch auf E2F-Zielgene zu, die Funktionen in den anderen zellulären Programmen innehaben. Da zum Beispiel pro-apoptotische E2F-1-Zielgene mit dem Fortschreiten des Zellzyklus interferieren würden, ist verständlich, dass ihre Expression anderweitig beeinflusst wird. Deshalb werden solche Zielgene von E2F-1 unabhängig von der Phase des Zellzyklus, in der sich die Zellen gerade befinden,



exprimiert. Gerade in den letzten Jahren steigt die Zahl von Zellzyklus-unabhängig regulierten E2F-1-Zielgenen, da in vielen Untersuchungen besonders darauf ein Augenmerk gelegt wurde (Iwanaga et al., 2006). Bekanntestes Beispiel ist *ARF*, dessen Expression durch E2F-1 induziert werden kann, sich aber während des Zellzyklus nicht signifikant ändert (Komori et al., 2005). Würde *ARF* besonders in der G1-Phase exprimiert, wäre seine inhibierende Wirkung kontraproduktiv für das Voranschreiten des Zellzyklus. Somit ist verständlich, dass es E2F-1-Zielgene gibt, deren Expression unabhängig vom Zellzyklus reguliert wird.

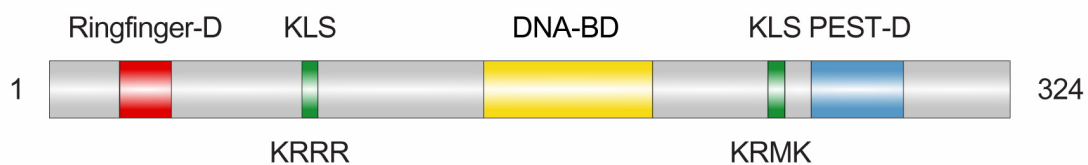
## 1.4 Der Transkriptionsfaktor BMI1

*Bmi1* (B lymphoma Mo-MLV insertion region 1) wurde als kooperierendes Onkogen bei der Bildung von B-Zell-Lymphomen in E $\mu$ *Myc*-transgenen Mäusen identifiziert (van Lohuizen et al., 1991; Haupt et al., 1991). E $\mu$ *Myc*-transgene Mäuse zeigen eine verstärkte Expression von *c-Myc*, dessen Produkt ein bekanntes Onkoprotein darstellt, in den B-Zellen. Da durch *c-Myc* allein Tumore erst nach einer Latenzzeit entstehen, wurde nach Kooperationspartnern zur Förderung der Lymphomagenese gesucht. Die Kooperation von *Bmi1* und *c-Myc* resultierte in einer Beschleunigung der Entstehung von Prä-B-Zell-Lymphomen (van Lohuizen et al., 1991). Wenig später wurde festgestellt, dass das *Mus musculus* *Bmi1* das Ortholog zum Polycomb-Gruppenprotein Psc (**P**osterior **s**ex **c**ombs) in *Drosophila melanogaster* darstellt (Brunk et al., 1991). Proteine der Polycomb-Gruppe sind für die Festlegung der Körperachsen von *Drosophila melanogaster* während der Entwicklung essentiell (Sato and Denell, 1985; Alkema et al., 1995). So war wenig verwunderlich, dass die gezielte Deletion von *Bmi1* in *Mus musculus* eine veränderte Skelettstruktur zur Folge hatte (van der Lugt et al., 1994). Außerdem zeigten die Tiere schwerwiegende, neurologische und hämatopoetische Defekte (van der Lugt et al., 1994). Dann konnte bestätigt werden, dass *Bmi1* in *Mus musculus* wie Psc in *Drosophila melanogaster* die *HOX*-Gene (**H**omöob**o**x-Gene), die ortholog zu den homeotischen Genen sind, reprimiert (van der Lugt et al., 1996). Dabei wurde schon diskutiert, dass dies durch die Bildung unterschiedlicher, repressorischer Komplexe realisiert wird (van der Lugt et al., 1996) (siehe 1.4.2). Neben dieser wichtigen Funktion von BMI1, konnte gezeigt werden, dass es den *INK4A/ARF*-Lokus reprimiert (Jacobs et al., 1999a). Dadurch beeinflusst BMI1 die Proliferation, die Seneszenz und die Apoptose. Dass BMI1 direkt den *INK4A/ARF*-Lokus bindet und so eine Repression ermöglicht, wurde erst kürzlich beschrieben (Bracken et al., 2007).

### 1.4.1 Die Strukturelemente von BMI1 und ihre Funktionen

Eine wesentliche Funktion der Mitglieder der Polycomb-Gruppe besteht in der Aufrechterhaltung der Repression der *HOX*-Gene. Da dies in den verschiedensten Organismen von Bedeutung ist, sind die Polycomb-Proteine hoch-konserviert. Die N-

terminal gelegene Ringfingerdomäne des 326 Aminosäuren umfassenden BMI1 (das *Mus musculus* Ortholog besteht aus 324 Aminosäuren) ist für die meisten seiner Funktionen essentiell (Abbildung 5). Die Ringfingerdomäne ist eine Form des Zinkfingers, besteht aus 40-60 Aminosäuren und kann zwei Zinkatome binden. BMI1 interagiert nicht nur über seinen Ringfinger mit einem zweiten BMI1-Molekül zur Homodimer-Bildung, sondern auch mit den Polycomb-Proteinen RING1a, RING1b und HPH2 (Satijn and Otte, 1999; Wei et al., 2006). Dadurch kann sich ein Komplex formieren, der einen Ubiquitin-Rest auf Histon H2A übertragen kann, wobei der Ringfinger von BMI1 entscheidend beteiligt ist (Wang et al., 2004a).



**Abbildung 5: Schematische Darstellung der Proteinstruktur von Bmi1 in *Mus musculus*.** Besonders hervorgehoben sind die Ringfinger- und die PEST-, sowie die DNA-Bindungsdomäne von Bmi1, die aus mehreren „Helix-Turn“-Motiven besteht. Die Aminosäureabfolgen der Kernlokalisationssignale sind unterhalb der Proteinstruktur dargestellt (KRRR: Lysin, Arginin, Arginin, Arginin, KRMK: Lysin, Arginin, Methionin, Lysin). Rot: Ringfinger-Domäne (Ringfinger-D). Grün: Kernlokalisationssignale (KLS). Gelb: DNA-Bindungsdomäne, die aus drei „Helix-Turn“-Motiven besteht (HTHTHT). Blau: PEST-Domäne (PEST-D). (Abbildung modifiziert nach (Cohen et al., 1996).

Neben der Ringfinger-Domäne sind die DNA-Bindungsdomäne, die aus drei „Helix-Turn“-Motiven (HTHTHT) besteht, eine C-terminale PEST-Domäne und ein Kernlokalisationssignal als besondere Strukturmerkmale von BMI1 zu erwähnen (Abbildung 5). Die DNA-Bindungsdomäne wird, wie die Ringfingerdomäne, zur Verlängerung der Lebensspanne von humanen, diploiden Fibroblasten WI-38 durch BMI1 benötigt (Itahana et al., 2003). BMI1 ist besonders zur Aufrechterhaltung der unbegrenzten Teilung von Stammzellen notwendig, wobei die HT-Motive und die Ringfingerdomäne von BMI1 wichtig sind (Lessard and Sauvageau, 2003; Iwama et al., 2004; Liu et al., 2006b). Des Weiteren konnte in transgenen Mäusen demonstriert werden, dass diese beiden Strukturelemente von BMI1 essentiell für sein onkogenes Potential sind (Alkema et al., 1997). In frühen *in vitro* Studien wurde beschrieben, dass nur die HT-Motive und nicht die Ringfingerdomäne für die transkriptionale Repression durch BMI1 nötig sind (Cohen et al., 1996). Die HT-Motive dienten jedoch in diesem Fall eventuell nur zur Rekrutierung von BMI1 im Komplex mit anderen Polycomb-

Proteinen. Die Funktion der Repression könnten andere Polycomb-Proteine übernommen haben, so dass die Ringfingerdomäne von BMI1 nicht mehr notwendig war. Eine andere Veröffentlichung zeigt hingegen, dass die Deletion der Ringfingerdomäne eine Erhöhung der ansonsten reprimierten *INK4A*-Expression zur Folge hat (Itahana et al., 2003). Das zeigt, dass die Ringfingerdomäne für die Funktion von BMI1 als transkriptionaler Repressor essentiell zu sein scheint.

Dagegen ist die PEST-Domäne von BMI1 bisher nicht näher untersucht worden. PEST-Domänen definieren Proteinbereiche, die reich an den Aminosäuren Prolin (P), Glutaminsäure (E), Serin (S) und Threonin (T) sind. Ferner wurde beobachtet, dass Proteine mit PEST-Domäne intrazellulär schnell abgebaut werden (Rogers et al., 1986). Dies scheint auch für BMI1, das eine ungefähre Halbwertszeit von 30 Minuten hat, zuzutreffen (Guo et al., 2007a).

#### 1.4.2 Die Polycomb-Komplexe und die Rolle von BMI1

BMI1 ist ein Mitglied der Polycomb-Gruppe, die für die stabile Repression der *HOX*-Gene während der Entwicklung essentiell ist. *HOX*-Gene sind durch eine charakteristische Homöodomäne gekennzeichnet, die ein in der Evolution hoch-konserviertes DNA-Bindungsmotiv kodiert, das drei  $\alpha$ -Helices bildet. Über dieses 60 Aminosäuren umfassende Polypeptid können die von *HOX*-Genen kodierten Transkriptionsfaktoren an Zielgene binden und die Musterbildung des Körpers steuern. Während der Entwicklung muss sowohl die Aktivierung bestimmter *HOX*-Gene durch die Trithorax-Gruppe als auch die Repression durch die Polycomb-Gruppe über mehrere Zellgenerationen hinweg bewahrt bleiben. Proteine der Polycomb-Gruppe bilden zwei repressorische Polycomb-Komplexe (**P**olycomb **R**epressive **C**omplexes, PRCs), die aus Kernkomponenten und variablen Elementen bestehen. Da die Polycomb-Proteine zuerst in *Drosophila melanogaster* entdeckt wurden und auch in dieser Spezies am besten untersucht sind, sollen zunächst die Kernkomponenten der Komplexe in dieser Spezies genannt werden. Der so genannte PRC2 (**P**olycomb **R**epressive **C**omplex **2**) ist aus Esc (**E**xtra **s**ex **c**ombs), E(Z) (**E**nhancer of **Z**este) und Su(Z)12 (**S**uppressor of **Z**este **12**) zusammengesetzt und für die Initiation der Repression verantwortlich. Er bindet zuerst an so genannte Polycomb responsive elements (PREs) und wird deshalb oft als Initiationskomplex bezeichnet. E(Z) stellt die katalytisch aktive Komponente dar, die

die Trimethylierung von hauptsächlich Lysin 27 ( $\text{H3K27me}^3$ ) und etwas geringer Lysin 9 von Histon H3 ( $\text{H3K9me}^3$ ) ermöglicht. Diese Histonmarkierung bewirkt durch die Veränderung der Chromatinstruktur die Repression der Promotoren, die in diesem Bereich liegen. Der PRC1 (**P**olycomb **R**epressive **C**omplex **1**) ermöglicht die Aufrechterhaltung dieser Repression und wird daher auch „Maintenance Complex“ genannt. Er besteht in *Drosophila melanogaster* aus Pc (**P**olycomb), Ph (**P**olyhomeotic), Psc (**P**osterior sex combs) und Sce/Ring (**S**ex combs extra), wobei das humane Ortholog zu Psc, wie bereits erwähnt, BMI1 ist (Brunk et al., 1991; van der Lugt et al., 1996). PRC1 kann durch die Chromodomäne von Pc die  $\text{H3K27me}^3$ -Markierung erkennen und wird wahrscheinlich dadurch zu den entsprechenden genomischen Regionen rekrutiert. Neuere Untersuchungen legen jedoch nahe, dass für die Rekrutierung des PRC1 die Histonmarkierung nicht notwendig ist (Francis et al., 2004). Dennoch zeigen die meisten Zielgene der Polycomb-Proteine über einen weiten Promotorbereich hinweg die  $\text{H3K27me}^3$ -Markierung (Schwartz et al., 2006).

Neben der Trimethylierung von Histon H3 können die PRCs ihre Zielgene durch direkte Blockierung des Transkriptionsinitiationsapparates und Verhinderung der Nukleosom-Remodellierung reprimieren (Wang et al., 2004b; Dellino et al., 2004). Außerdem besitzt der PRC1 Ubiquitin-E3-Ligaseaktivität und nutzt diese ebenfalls zur Repression von Zielgenen. Dabei wird ein Ubiquitin-Rest vom E2-Ubiquitin-Thiolester übernommen und auf das Ziel dieser Ubiquitinierung, Lysin 119 von Histon H2A, übertragen. Die Verbindung für diesen Transfer stellt u.a. die Ringfingerdomäne von BMI1 her (Wang et al., 2004a; Cao et al., 2005). Neuere Untersuchungen zeigen, dass BMI1 für die Integrität des Komplexes notwendig ist und es daher die Ubiquitinierung von Histon H2A *in vitro* und *in vivo* stimuliert (Wei et al., 2006). Die Übertragung des Ubiquitins auf Histon H2A ist ein Signal für die Stilllegung des umgebenden Chromatinbereiches (Wang et al., 2004a). So kann BMI1 im PRC1 über die Veränderung der Chromatinstruktur als Repressor wirken. Die Rekrutierung von DNMTs (**D**NA **m**ethyltransferases, DNA-Methyltransferasen) durch EZH2, ein humanes Ortholog zu E(Z), zu speziellen Zielgenen wird ebenfalls als Mechanismus der Repression durch PRCs diskutiert (Vire et al., 2006).

Den Polycomb-Komplexen wird außerdem eine Funktion in der stabilen Inaktivierung des zweiten X-Chromosoms in weiblichen Säugetieren zugeschrieben (Hernandez-Munoz et al., 2005; Mak et al., 2002; Wang et al., 2001). Dabei wurde beobachtet, dass BMI1 und die Histonvariante MACROH2A ubiquitiniert werden. Durch die Hemmung

der Ubiquitinierung oder Verringerung der MACROH2A-Levels erfolgte die Reaktivierung des zweiten X-Chromosoms (Hernandez-Munoz et al., 2005). Die Bedeutung der Ubiquitinierung von BMI1 in diesem Kontext wurde bisher nicht näher untersucht. Des Weiteren ist zu erwähnen, dass es ein Homolog zu BMI1, MEL-18, gibt, dessen Aminosäuresequenz zu 80% mit der von BMI1 übereinstimmt (Goebel, 1991). Im Bereich der Ringfingerdomäne sind die beiden Proteine nahezu identisch, während der C-Terminus größere Abweichungen zeigt. Doch aufgrund ihrer unterschiedlichen Expression, scheinen BMI1 und MEL-18 verschiedene Funktionen auszuführen. Die *MEL-18*-Expression beschränkt sich auf Zellen neuralen Ursprungs und Fetalzellen (Tagawa et al., 1990). *BMI1* wird dagegen in vielen verschiedenen Geweben exprimiert, wenn auch stets geringer als in transformierten Zellen (Haupt et al., 1991). Außerdem zeigt MEL-18 im Vergleich zu BMI1 eher Tumor-suppressive statt -fördernde Effekte (Kanno et al., 1995; Akasaka et al., 1996; Tetsu et al., 1998). Diese konträren Funktionen sind überraschend in Hinblick auf die hohe Übereinstimmung der Sequenz. Eine Erklärung wäre, dass über den Anteil BMI1 gegenüber MEL-18 im PRC1 die Zielgenspezifität und Wirkung auf die Proliferation geregelt wird. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass MEL-18 die *BMI1*-Expression inhibiert (Guo et al., 2007a; Guo et al., 2007b). Dazu reprimiert MEL-18 c-MYC, das über die Bindung an den *BMI1*-Promotor dessen Expression stimuliert (Guo et al., 2007a). Dadurch könnte gewährleistet werden, dass tatsächlich nur BMI1 oder MEL-18 Teil des PRC1 sind und seine Wirkung beeinflussen.

### 1.4.3 Die Rolle von BMI1 in der Entwicklung

Die vielfältigen Funktionen von BMI1 wurden durch die Analyse von *Bmi1*-defizienten Mäusen besonders deutlich. *Bmi1*<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden zwar im richtigen Verhältnis nach Mendel geboren, etliche Mäuse starben aber in den ersten Tagen nach der Geburt aufgrund der Tötung durch das Muttertier (van der Lugt et al., 1994). Ursache dafür waren wahrscheinlich die reduzierte Fitness und ein abnormales Verhalten. Dies äußerte sich zum einen durch einen unsicheren Gang und spontane, Epilepsie-artige Anfälle, ausgelöst durch eine massive Verringerung der Zelldichte und -zahl im Kleinhirn. Zum anderen führte eine verringerte Hämatopoese im Knochenmark zu sinkenden Zahlen von Blutzellen. Zusätzlich zeigten sich eine verringerte Milzgröße und eine

Rückbildung des Thymus im Vergleich zu Wildtyp-Tieren. Dies macht deutlich, dass *Bmi1* für die korrekte Entwicklung des Skeletts und des Gehirns sowie für die Hämatopoese notwendig ist. Weitere Funktionen von *Bmi1* wurden durch die Analyse von primären MEFs, die *Bmi1*-defizient waren, offensichtlich. So proliferieren diese Zellen weniger und werden zeitiger seneszent als die Wildtyp-MEFs (Jacobs et al., 1999a). Dies wird teilweise durch die Erhöhung der Mengen von  $p16^{\text{INK4A}}$  und  $p19^{\text{ARF}}$ , deren Genlokus ein repressorisches Ziel von *Bmi1* darstellt, verursacht (Jacobs et al., 1999a). Durch Verlust von  $p16^{\text{INK4A}}$  und  $p19^{\text{ARF}}$  in *Bmi1*-defizienten Mäusen konnten die neuronalen Defekte teilweise revertiert werden (Molofsky et al., 2005). Dass der Phänotyp der *Bmi1*<sup>-/-</sup>-Mäuse dadurch nicht vollkommen aufhebbar ist, zeigt jedoch, dass noch andere *Bmi1*-Zielgene bei der Ausübung seiner Funktionen in der Entwicklung und Proliferation essentiell sind. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass bei Verringerung von *Bmi1* die Mengen vom Zellzyklusinhibitor  $p21^{\text{CIP1}}$  in neuronalen Vorläuferzellen erhöht werden (Fasano et al., 2007). Schon während der embryonalen Entwicklung scheint dabei die Repression von *CIP1* durch *Bmi1* für die Proliferation der neuronalen Vorläuferzellen von Bedeutung zu sein. Ebenfalls wurde verdeutlicht, dass *Bmi1* während der gesamten neuronalen Entwicklung, von embryonalen Stadien bis nach der Geburt, wichtig ist (Fasano et al., 2007).

#### **1.4.4 Der Einfluss von BMI1 auf die Proliferation und die Selbsterneuerung von Stammzellen**

Der positive Einfluss von BMI1 auf die Proliferation wird auch durch seine Induktion der Telomeraseaktivität deutlich (Dimri et al., 2002). Die Enden von linearen, eukaryotischen Chromosomen werden Telomere genannt und bestehen aus Wiederholungen einer G-reichen Sequenz. Die Telomerase ist eine RNA-enthaltene DNA-Polymerase, die das wiederholte Anhängen dieser Sequenz katalysiert. Ohne die Telomere würden die Chromosomen mit der Zeit immer kürzer werden, was zum Verlust genetischer Information und letztendlich zum Tod der Zellen führen würde. Die Integrität der Telomere ist deshalb für die unbegrenzte Proliferation essentiell. So resultiert die durch Überexpression von *BMI1* induzierte Telomeraseaktivität in Brustepithelzellen in der Verlängerung der replikativen Lebensspanne und in der Immortalisierung (Dimri et al., 2002).

Besonders ist die Rolle von BMI1 bei der Proliferation und Aufrechterhaltung der Selbsterneuerung von Stammzellen hervorzuheben. So war die Anzahl von HSCs (**hematopoetic stem cells**, hämatopoetische Stammzellen) in postnatalen *Bmi1*<sup>-/-</sup>-Mäusen deutlich verringert und die reduzierte Selbsterneuerung von neuronalen *Bmi1*<sup>-/-</sup>-Stammzellen führte zu deren Depletion nach der Geburt der Mäuse (Park et al., 2003; Molofsky et al., 2003). Eine andere Forschergruppe beobachtete, dass die *Bmi1*-Defizienz in normalen und leukämischen HSCs einen Proliferationsarrest und Anzeichen einer Differenzierung und Apoptose zur Folge hatte (Lessard and Sauvageau, 2003). Das stellte sogleich die Verbindung zwischen der Funktion von BMI1 für Stammzellen und seiner Rolle bei der Tumorentstehung her. Entsprechend der Tumorstammzelltheorie, besitzt nur ein kleiner Teil von Zellen im Tumor die Fähigkeit, den Tumor in Transplantationsexperimenten neu zu konstituieren (Bonnet and Dick, 1997). Für diese Tumorstammzellen könnte BMI1 zur Aufrechterhaltung ihres proliferativen Potentials notwendig sein. Dies wird unterstützt durch die Beobachtung, dass BMI1 die Selbsterneuerung von normalen und tumorigenen Bruststammzellen des Menschen reguliert (Liu et al., 2006b). Außerdem wurden in einer geringen Anzahl von Plattenepithelkarzinomzellen, aus denen sich wieder neue, heterogene Tumore nach Transplantation in der Maus entwickeln konnten, hohe *Bmi1*-Levels detektiert (Prince et al., 2007).

#### **1.4.5 BMI1 in Tumoren**

Schon durch seine Entdeckung als Kooperationspartner von c-Myc bei der Entstehung von B-Zell-Lymphomen wurde deutlich, dass *Bmi1* das Tumorstadium begünstigt (van Lohuizen et al., 1991; Haupt et al., 1991). Die Ursache dafür liegt in der Hemmung der Myc-induzierten Apoptose durch Repression von *ARF* (Jacobs et al., 1999b; Bracken et al., 2007). Dadurch wird das Überleben von Zellen mit einer Deregulation von Myc und somit die Tumorbildung ermöglicht. Die Überexpression von *Bmi1* im B-Zell-Kompartiment in Eμ*Bmi1*-transgenen Mäusen resultierte in einer Prädisposition für Lymphome, was ebenfalls beweist, dass *Bmi1* ein potentes Onkogen ist (Alkema et al., 1997). In den vergangenen Jahren wurden eine Überexpression oder seltener eine Amplifikation von *BMI1* in den verschiedensten Tumoren gefunden. Zu den Tumoren mit erhöhtem BMI1-Level gehören Leukämien, verschiedene B-Zell-Lymphome,



Tumore des Gastrointestinaltraktes, der Lunge oder des Kleinhirns sowie Prostatakrebs (Sawa et al., 2005; Bea et al., 2001; van Galen et al., 2007; Breuer et al., 2004; Leung et al., 2004; Reinisch et al., 2006; Marker, 2007; van Leenders et al., 2006). Das verstärkte Auftreten von hohen BMI1-Mengen in vielen Tumorarten spricht für die Bedeutung von BMI1 in der Tumorgenese.

#### 1.4.6 Die Regulation von BMI1

Zu Beginn meiner Doktorarbeit war nichts über eine transkriptionale Regulation von *BMI1* bekannt. Erst kürzlich wurde über die Repression der *BMI1*-Expression durch sein Homolog MEL-18 berichtet. Jedoch scheint diese Regulation nicht direkt zu sein, sondern über einen Zwischenschritt, der Hemmung von c-Myc, abzulaufen (Guo et al., 2007a; Guo et al., 2007b) (siehe 1.4.2). Lange Zeit waren nur eine posttranslationale Phosphorylierung und die Involvierung eines Entwicklungssignalweges als Regulationswege von BMI1 bekannt.

BMI1 kann von der MAPKAPK3 (**MAPK-activated protein kinase 3**, MAPK-aktivierte Proteinkinase 3), auch bekannt als 3pK, phosphoryliert werden, was jedoch keinen Einfluss auf seine Aktivität oder Mengen hat (Voncken et al., 2004). Schon früher konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von BMI1 mit seiner Zellzyklus-abhängigen Chromatinassoziation invers korreliert (Voncken et al., 1999). Während der G1- und S-Phase des Zellzyklus ist hypophosphoryliertes BMI1 an Chromatin gebunden (Voncken et al., 1999). In der G2- und M-Phase wird BMI1 von 3pK phosphoryliert, dissoziiert vom Chromatin und BMI1-Zielgene werden nicht mehr reprimiert (Voncken et al., 2004). So bewirkt eine Überexpression von *3pK* die Phosphorylierung von BMI1 und eine Derepression von *ARF*.

Ferner konnte eine Verbindung von BMI1 mit dem Shh (**Sonic hedgehog**)-Signalweg hergestellt werden (Leung et al., 2004). Dieser Signalweg spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung und besonders der Organbildung von Vertebraten. Extrazelluläres Shh kann an seine Rezeptoren binden und setzt damit eine Signalkaskade in Gang, die letztendlich zur Aktivierung der Gli-Transkriptionsfaktoren führt. Wurde die Proliferation von granulären Zellkulturen des Kleinhirns durch Behandlung mit Shh angeregt, kam es neben der erwarteten Induktion von *Gli1* auch zum Anstieg der *BMI1*-mRNA (Leung et al., 2004). Ferner korrelierten hohe BMI1-Mengen in Kleinhirn-

tumoren mit einer Aktivierung des Shh-Signalweges. Wie genau diese Regulation abläuft und ob eine direkte Interaktion vorliegt, konnte bisher nicht geklärt werden.

## 1.5 Die FOXO-Transkriptionsfaktoren

Die Proteinfamilie der Forkhead-Transkriptionsfaktoren ist durch eine konservierte, 110 Aminosäuren umfassende DNA-Bindungsdomäne, die wegen der Struktur oft als geflügelte Helix (winged helix) bezeichnet wird, gekennzeichnet. Dieses Motiv, auch als Fox (**F**orkhead **box**, Forkhead-Box) bekannt, gab dem ersten Mitglied dieser Klasse, das in *Drosophila melanogaster* identifiziert wurde, seinen Namen (Weigel et al., 1989). Mit der Zeit wurden zahlreiche Proteine in *Saccharomyces cerevisiae* bis hin zu *Homo sapiens* gefunden, die dieses Motiv ebenfalls besaßen. Sie wurden entsprechend einer Klassifizierung in Untergruppen der Fox-Proteine eingeteilt (Kaestner et al., 2000).

### 1.5.1 Die Eigenschaften und Funktionen der Untergruppe O der Forkhead-Transkriptionsfaktoren

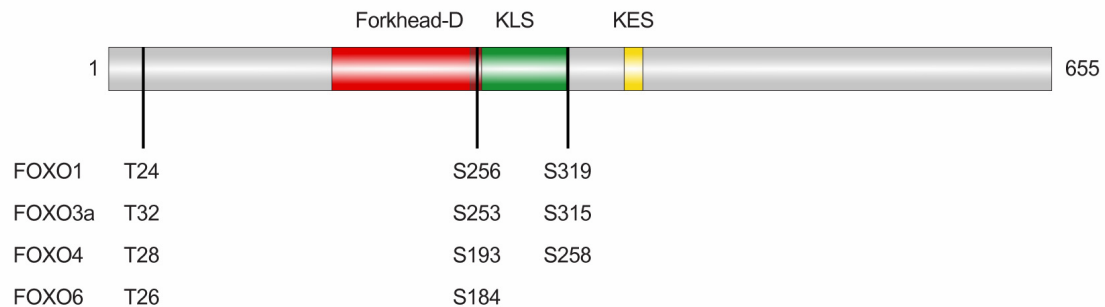
Die O-Untergruppe der Fox-Transkriptionsfaktoren besteht in Säugetieren aus vier Mitgliedern: FOXO1, FOXO3a, FOXO4 und FOXO6. In Invertebraten gibt es jeweils nur ein *FOXO*-Gen, *daf-16* in *Caenorhabditis elegans* und *dFOXO* in *Drosophila melanogaster*. Die FOXOs wurden im Menschen zunächst als chromosomale Translokationen in Rhabdomyosarkomen und in AMLs (**a**cute **m**yeloid **l**eukemias, akuten, myeloiden Leukämien) identifiziert (Galili et al., 1993; Shapiro et al., 1993; Parry et al., 1994). In Rhabdomyosarkomen, die maligne Tumore der Skelettmuskulatur sind, ist durch die Translokation der C-terminale Bereich des *FOXO1*-Gens mit dem N-Terminus von *PAX3* oder *PAX7* fusioniert (Galili et al., 1993; Shapiro et al., 1993; Davis et al., 1994). Während die N-terminale Forkhead-Domäne damit trunziert ist, besitzt das entstandene Fusionsprotein noch die Transaktivierungsdomäne von FOXO1. Das Ergebnis der Translokation in AMLs ist eine Fusion von FOXO4 und dem MLL (**m**ixed-lineage **l**eukemia)-Gen (Parry et al., 1994; Borkhardt et al., 1997). Als vorerst letztes Mitglied wurde FOXO6 identifiziert, das einige Abweichungen von den anderen drei FOXOs zeigt und dessen Expression weitestgehend auf das Gehirn beschränkt ist (Jacobs et al., 2003) (siehe 1.5.2).

Die FOXO-Transkriptionsfaktoren können als Aktivatoren und Repressoren wirken. Um den Funktionen der FOXO-Transkriptionen auf den Grund zu gehen, wurden *FOXO*-defiziente Mäuse erzeugt. Die Deletion von *FOXO1* resultierte im Tod der Embryonen am Tag 11 aufgrund von Defekten in der Lunge und bei der Entwicklung der Gefäße (Hosaka et al., 2004; Furuyama et al., 2004). Die funktionellen Unterschiede zwischen den FOXOs werden dadurch deutlich, dass die *FOXO3a*- und *FOXO4*-Defizienz nicht zum Tod der Embryonen führt (Hosaka et al., 2004). Die Tiere werden geboren und scheinen keine Defekte zu haben. Mit zunehmendem Alter werden jedoch die *FOXO3a*-defizienten Weibchen frühzeitig unfruchtbar. Die Ursache dafür ist eine anormale Entwicklung der Follikel in den Eierstöcken (Castrillon et al., 2003; Hosaka et al., 2004). Bei den *FOXO4*-defizienten Mäusen konnten bisher keine Unterschiede im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren festgestellt werden (Hosaka et al., 2004). Kürzlich wurden Tiere mit der konditionalen Zerstörung beider Allele aller drei FOXOs erzeugt und beschrieben (Paik et al., 2007; Tothova et al., 2007). Die Tiere entwickelten Thymuslymphome, die später auch Milz, Leber und Lymphknoten befielen (Paik et al., 2007). Zusätzlich bildeten sich Hämangiome, die sich von der Gebärmutter aus auf andere Organe ausdehnten. Die dreifache Deletion im hämatopoetischen System zeigte vielfältige Defekte bei der Entwicklung des Blutsystems (Tothova et al., 2007). Außerdem wurde ein Anstieg von ROS (**r**eactive **o**xxygen **s**pecies, reaktive Sauerstoffverbindungen, siehe 1.5.7) detektiert und die Verringerung der längerfristigen Fähigkeit zur Selbsterneuerung von hämatopoetischen Stammzellen. Diese Studien weisen schon auf etliche Funktionen der FOXO-Transkriptionsfaktoren hin, von denen einige später näher betrachtet werden sollen (siehe 1.5.4 bis 1.5.7). Zur Ausführung der, von den FOXOs regulierten, zellulären Programme sind bestimmte Strukturelemente essentiell, die im Folgenden betrachtet werden.

### **1.5.2 Die Strukturelemente der FOXOs**

Für die Funktion der FOXOs sind zwei Domänen essentiell: die DNA-bindende Forkhead-Domäne und die Transaktivierungsdomäne (Abbildung 6). Über die N-terminale Forkhead-Domäne können sie die Konsensus-Sequenz 5'-TTGTTTAC-3' binden, die auch als FRE (**F**orkhead-**r**esponsive **e**lement, Forkhead-Bindungsstelle) bezeichnet wird (Furuyama et al., 2000). Die Bindung der Promotoren ist für die

transkriptionale Aktivierung der Zielgene der FOXOs essentiell. Für die Repression durch die FOXOs wurde beobachtet, dass eine DNA-Bindung nicht notwendig ist (Ramaswamy et al., 2002; Bouchard et al., 2004). Des Weiteren wird auch die transkriptionale Regulation von anderen Transkriptionsfaktoren für die Hemmung nicht benötigt (Schmidt et al., 2002). Das lässt darauf schließen, dass FOXOs für die Repression von Zielgenen durch andere Regulatoren rekrutiert werden können.



**Abbildung 6: Schematische Darstellung der Proteinstruktur von FOXO1 sowie Aminosäurenreste, die von PKB/AKT phosphoryliert werden.** Über die konservierte Forkhead-Domäne (Forkhead-D) erfolgt die DNA-Bindung der FOXOs. Sie besitzen sowohl ein Kernlokalisations- (KLS) als auch ein Kernexportsignal (KES). Über die genaue Position der C-terminalen Transaktivierungsdomäne gibt es in der Literatur widersprüchliche Angaben. Unter der Struktur sind die Aminosäurenreste der FOXOs aufgelistet, die von PKB phosphoryliert werden. Rot: Forkhead-Domäne (Forkhead-D). Grün: KLS. Gelb: KES. (Abbildung modifiziert nach (van der Heide et al., 2004).

Über die C-terminale Transaktivierungsdomäne erfolgt die Induktion der FOXO-Zielgene. Außerdem ist diese Domäne für die transformierende Aktivität der, durch Translokationen entstandenen, FOXO-Fusionsproteine notwendig (So and Cleary, 2002; So and Cleary, 2003). Eine genaue Kartierung der Transaktivierungsdomäne wurde bisher jedoch nicht vorgenommen.

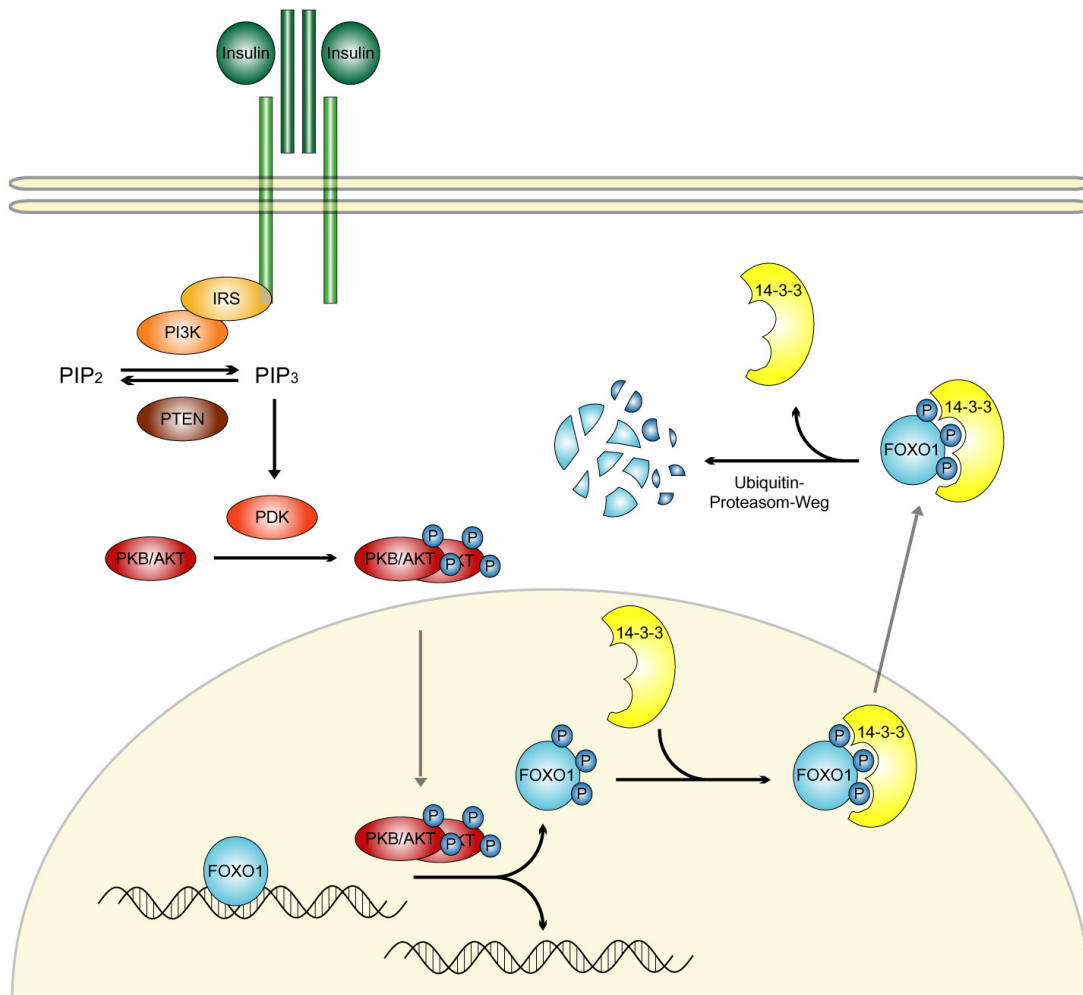
Neben diesen beiden Domänen sind eine Reihe von Serin- und Threonin-Resten für die Regulation der FOXOs von Bedeutung (Brunet et al., 1999; van der Heide et al., 2004; Rena et al., 1999; Jacobs et al., 2003; van der Heide et al., 2004) (Abbildung 6). Diese Aminosäuren sind zwischen FOXO1, FOXO3a und FOXO4 konserviert und dienen als Angriffspunkte der Phosphorylierung durch verschiedene Kinasen. In FOXO6, das als letztes Mitglied identifiziert wurde, fehlt ein besonders hoch-konservierter Bereich mit vielen Phosphorylierungsstellen (Jacobs et al., 2003). Dadurch ist wahrscheinlich der übermäßig hohe Anteil von FOXO6 im Zellkern nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren zu erklären. Die anderen FOXOs werden nach Stimulation an bestimmten

Aminosäureresten phosphoryliert, was ein Signal für ihren Export aus dem Zellkern ins Zytoplasma darstellt (Brunet et al., 1999) (Abbildung 7).

### 1.5.3 Die Regulation der FOXOs auf posttranslationaler Ebene

Die am besten untersuchte Regulation der FOXOs ist die Phosphorylierung durch die PKB (**P**roteink**i**nkase **B**, Synonym Akt) im Insulin/PI3K/PKB-Signalweg. Binden das körpereigene Hormon Insulin oder Wachstumsfaktoren extrazellulär an ihre Rezeptoren wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt. Die PI3K (**P**hospho**i**nositid-**3**-**K**inase) wird intrazellulär zu den Rezeptoren rekrutiert und phosphoryliert dort PIP<sub>2</sub> (**P**hosphatidyl-**i**nositol-4,5-**bis**phosphat) zu PIP<sub>3</sub> (**P**hosphatidyl**i**nositol-1,4,5-**tri**phosphat). Ihr direkter Gegenspieler ist die Phosphatase PTEN (**p**hosphatase and **t**ensin homolog **d**eleted on **c**hromosome **ten**), die durch Spaltung von PIP<sub>3</sub> wieder PIP<sub>2</sub> entstehen lässt. Zu PIP<sub>3</sub> wird die PDK (**P**hosphoinositide-**d**ependent **k**inase, Phosphoinositid-abhängige Kinase) rekrutiert, die durch Phosphorylierung die PKB aktiviert. Die PKB hat viele Substrate, zu denen auch die FOXOs gehören. An spezifischen Threonin- und Serinresten werden die FOXOs *in vitro* und *in vivo* durch die PKB phosphoryliert (Brunet et al., 1999; Biggs, III et al., 1999; Rena et al., 1999; Brownawell et al., 2001) (Abbildung 6). Die Inhibierung der PI3K hebt dementsprechend auch die Phosphorylierung der FOXOs auf (Rena et al., 1999). Die phosphorylierten FOXOs werden durch 14-3-3-Proteine gebunden und aus dem Nukleus exportiert (Brunet et al., 1999; Biggs, III et al., 1999) (Abbildung 7). Zum einen agieren die 14-3-3-Proteine dabei als Chaperone, zum anderen erfolgt durch ihre Bindung wahrscheinlich eine Konformationsänderung, die zur Freilegung des KES der FOXOs führt (Brunet et al., 1999). Außerdem wird vermutlich das KLS der FOXOs durch ein 14-3-3-Molekül maskiert. Im Zytoplasma können die FOXOs nicht transkriptional aktiv sein und werden durch den Ubiquitin-Proteasom-Weg abgebaut (Matsuzaki et al., 2003; Plas and Thompson, 2003). Bei der dabei erfolgenden Polyubiquitinierung differiert die Zusammensetzung des katalytisch aktiven E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexes zwischen den verschiedenen FOXOs (Huang et al., 2005). Für FOXO1 konnte nachgewiesen werden, dass es mit Skp2, einer Untereinheit eines E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexes, interagiert und von diesem inhibiert wird (Huang et al., 2005). Die Monoubiquitinierung von FOXO4 resultiert dagegen in einer Relokalisation in den Zellkern und Erhöhung der transkriptionalen

Aktivität (van der et al., 2006a). Die Interaktion von FOXO4 mit USP7 (Ubiquitin-spezifischen Protease 7, Synonym HAUSP) kommt nach oxidativem Stress zustande und führt zur Deubiquitinierung (van der et al., 2006b).



**Abbildung 7: Darstellung der Regulation von FOXO1 durch den Insulin/PI3K/PKB-Signalweg.** Durch Bindung von Insulin an seinen Rezeptor erfolgt die Aktivierung der PI3K, der PDK und der PKB/AKT. PKB/AKT phosphoryliert FOXO1, das daraufhin von 14-3-3 gebunden und aus dem Zellkern transferiert wird. Im Zytoplasma wird FOXO1 dann durch den Ubiquitin-Proteasom-Weg abgebaut.

Neben der PKB gibt es noch eine Reihe anderer Kinasen, die die FOXOs an verschiedenen Resten phosphorylieren. Auch die SGK (serum and glucocorticoid inducible kinase) wird durch die PDK aktiviert und die Phosphorylierungsstellen stimmen teilweise mit denen der PKB überein (Brunet et al., 2001). Weitere Kinasen, die die FOXOs an verschiedenen Resten phosphorylieren können, sind die IKK $\beta$  (Inhibitor of NF- $\kappa$ B kinase  $\beta$ , Kinase des Inhibitors von NF- $\kappa$ B  $\beta$ ), die JNK (Jun N-terminal kinase, Jun N-terminale Kinase), die DYRK (dual-specificity tyrosine

phosphorylation-regulated kinase) und die CK1 (casein kinase 1, Kaseinkinase 1) (Greer and Brunet, 2005). Vor kurzem wurde entdeckt, dass CDK2 zur Phosphorylierung der FOXO-Transkriptionsfaktoren fähig ist (Huang et al., 2006). Dadurch erfolgt eine zytoplasmatische Lokalisation und Inhibierung der FOXO, die nach DNA-Schäden wieder aufgehoben wurde (Huang et al., 2006). Des Weiteren sind die Acetylierung und Deacetylierung als regulatorische Mechanismen der FOXOs bekannt. Es konnte gezeigt werden, dass die Acetyltransferasen CBP und p300 die FOXOs binden und sie acetylieren können (Mahmud et al., 2002; Fukuoka et al., 2003). Dadurch wird die FOXO-Aktivität verändert, wobei noch diskutiert wird, ob dies eine Aktivierung oder Repression der FOXOs darstellt (van der Heide and Smidt, 2005; Giannakou and Partridge, 2004). Die Deacetylierung der von CBP und p300 acetylierten Lysinreste kann durch die NAD-abhängige Proteindeacetylase SIRT1 erfolgen (Kobayashi et al., 2005; van der et al., 2004; Motta et al., 2004).

Somit sind inzwischen vielfältige Wege der Regulation der FOXOs aufgedeckt. Die stattfindenden Modifikationen sind stets posttranslational. Bisher gibt es keine Information, ob und wie die FOXO-Transkriptionsfaktoren auf transkriptionaler Ebene reguliert werden. Da die FOXOs in vielen, zellulären Prozessen involviert sind, ist wahrscheinlich, dass auch ihre Expression durch andere Transkriptionsfaktoren beeinflusst wird.

#### **1.5.4 Die FOXO-vermittelte Regulation der Proliferation**

FOXO-Transkriptionsfaktoren können den Arrest von Zellen im Zellzyklus induzieren und sind damit negative Regulatoren der Proliferation (Abbildung 8). Das wird zum einen durch die direkte Aktivierung des *KIP1*-Gens, das für den Zellzyklusinhibitor p27<sup>KIP1</sup> kodiert, ermöglicht (Medema et al., 2000; Collado et al., 2000). p27<sup>KIP1</sup> hemmt die Komplexe aus Typ E Zyklinen und CDK2 und möglicherweise auch die aus Typ D Zyklinen und CDK4/6. Diese Komplexe sind für die Phosphorylierung der Pocketproteine notwendig. Dann dissoziieren die Pocketproteine von den E2Fs, die daraufhin essentielle Gene für den Übergang von der G1- zur S-Phase des Zellzyklus induzieren können. Zu Beginn der G1-Phase wird p27<sup>KIP1</sup> kontinuierlich abgebaut. Erfolgt jedoch eine Aktivierung von p27<sup>KIP1</sup>, dann resultiert dies in einem G1/S-Arrest der Zellen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Repression der Typ D Zykline



durch die FOXOs zum Zellzyklusarrest beiträgt (Ramaswamy et al., 2002; Schmidt et al., 2002). Diese Zykline bilden speziell mit CDK4 oder CDK6 Komplexe, um die Pocketproteine zu phosphorylieren und so letztendlich den Übergang zur S-Phase zu ermöglichen. Darüber hinaus können FOXO3a und FOXO4 die Induktion des Pocketproteins p130 bewirken (Kops et al., 2002b). Damit wird die E2F-abhängige Aktivierung zur Progression im Zellzyklus gehemmt und die Zellen treten in einen reversiblen Ruhezustand, genannt Quieszenz, ein. Von besonderer Relevanz ist, dass bereits transformierte Zellen eines menschlichen Darmkarzinoms nach der Aktivierung der FOXOs quieszent werden und nicht weiter proliferieren. Dieses Phänomen kann durch die Aktion der PKB, die die FOXOs inhibiert und die p130-Levels beim Wiedereintritt der Zellen in den Zellzyklus regulieren, revertiert werden (Kops et al., 2002b). Somit stehen die FOXOs den Wachstum-stimulierenden Effekten der PKB direkt gegenüber und ihre Inaktivierung durch die PKB trägt zur Transformation von Zellen bei.

### 1.5.5 Die FOXO-induzierte Apoptose

Neben der Induktion des Zellzyklusarrestes stellt die Induktion der Apoptose einen weiteren Mechanismus dar, über den die FOXOs die Tumorgenese hemmen können (Abbildung 8). Das erste pro-apoptotische Zielgen der FOXOs, das identifiziert wurde, war das Gen für FasL (**Fas-Ligand**) (Brunet et al., 1999). Dieser induziert durch Bindung an den Fas-Rezeptor eine Signalkaskade, die in der Apoptose der Zellen resultiert. Im *Fas-Ligand*-Promoter befinden sich drei FREs, über die FOXO3a binden und die Transkription aktivieren kann (Brunet et al., 1999). Neben dem Fas-Liganden ist BIM, ein BH3-Domänen-Protein, das die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien begünstigt, ein wichtiges pro-apoptotisches Ziel der FOXOs. In einer Prä-B-Zelllinie stiegen die BIM-Mengen nach Überexpression von *FOXO3a* deutlich an und sympathische Neuronen wurden apoptotisch, nachdem die *BIM*-Expression durch Überexpression der *FOXOs* erhöht wurde (Dijkers et al., 2000; Gilley et al., 2003). Dabei konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von BIM direkt, ohne die Bildung von anderen Regulatoren, und durch die Bindung von FOXO3a an FREs im *BIM*-Promoter erfolgt. TRAIL (**TNF-related apoptosis inducing ligand**), das durch Bindung an die Todesrezeptoren DR4 und DR5 (**death receptors**) Apoptose induzieren kann,

gehört ebenfalls zu den von FOXOs aktivierten pro-apoptotischen Proteinen (Modur et al., 2002). Im *TRAIL*-Promotor wurde entsprechend auch ein FRE gefunden, dass für die FOXO3a-vermittelte Transkription von *TRAIL* notwendig ist.

#### **1.5.6 Die Verbindung von E2F-1 und den FOXOs in der Apoptose**

Es gibt eine Reihe von Untersuchungen, deren Ergebnisse auf eine mögliche Verbindung von E2F-1 und den FOXOs in der Apoptose hindeuten. So aktivieren sowohl E2F-1 als auch die FOXOs die Expression des pro-apoptotischen Gens *BIM* (Hershko and Ginsberg, 2004; Sunters et al., 2003; Gilley et al., 2003). Des Weiteren inhibiert die PKB sowohl die FOXOs durch Phosphorylierung, als auch die durch E2F-1 induzierte Apoptose (Brunet et al., 1999; Biggs, III et al., 1999; Kops et al., 1999; Hallstrom and Nevins, 2003). Speziell in neuronalen Zellen sind ferner Aktivitätsveränderungen der FOXOs und E2F-1 bei Entzug von NGF (Nerve Growth Factor, Nervenwachstumsfaktor), was zur neuronalen Apoptose führt, zu erwähnen (Pittman et al., 1993). NGF bewirkt eine Aktivierung des PI3K/PKB-Signalweges, was eine FOXO-Phosphorylierung und damit -Inhibierung zur Folge hat (Kim et al., 2004). Der Entzug von NGF resultiert dementsprechend in einer verringerten Phosphorylierung und somit Erhöhung der aktiven Menge der FOXOs. Wird neuronalen Zellen NGF entzogen, erfolgt außerdem eine Derepression von E2F-1-Zielgenen, die für die neuronale Apoptose essentiell sind (Liu and Greene, 2001).

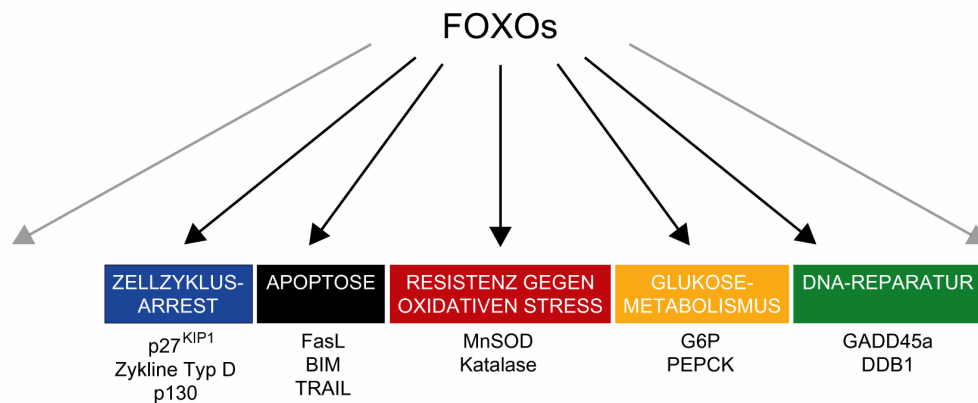
Diese Punkte ließen eine Rolle der FOXOs in der E2F-1-vermittelten Apoptose, besonders von neuronalen Zellen, vermuten. Unterstützt wurde dies durch das Auftreten spezieller genetischer Veränderungen bei der Entwicklung von Glioblastomen aus Astrozytomen. Das Glioblastom ist das bösartigste höhergradige Gliom, das mit einer sehr schlechten Prognose für den Patienten verbunden ist. In Astrozytomen kommt es neben p53-Mutationen häufig zum Funktionsverlust von pRB und zu einer Inaktivierung von PTEN. Dabei ist das simultane Auftreten der Veränderungen von pRB und PTEN auffällig (Xiao et al., 2002). Der Verlust oder die Inhibierung von pRB resultiert in einer erhöhten Menge von aktivem E2F-1. Dieses könnte dann verstärkt Proliferation oder Apoptose induzieren. Meist liegt zusätzlich eine Mutation eines Gens des pro-apoptotischen Signalweges vor, um ein Entgehen der Apoptose für die Tumorzellen zu ermöglichen. Durch Mutationen, die zur Inaktivierung von PTEN

führen, erfolgt eine stärkere Aktivierung von Akt, die in einer Erhöhung der Phosphorylierung und damit Inhibierung der FOXOs resultiert. Wäre die E2F-1-vermittelte Apoptose in diesen neuronalen Tumoren von den FOXOs abhängig, so wäre die Wirkung von pRB-Verlust und PTEN-Inaktivierung eine stärkere Proliferation der Tumorzellen und ein Entgehen der Apoptose. Zudem kann die E2F-1-induzierte Apoptose in neuronalen Zellen p53-unabhängig ablaufen (Giovanni et al., 2000). Ferner treten in Gliosarkomen, einer Variante von Glioblastomen, mit 53% recht häufig Beeinträchtigungen des pRB-Signalweges auf und ein PTEN-Verlust wurde in 37% der Fällen registriert (Reis et al., 2000). In Anbetracht dieser Punkte wurde die Hypothese aufgestellt, dass die E2F-1-induzierte Apoptose über eine Aktivierung von FOXO-Transkriptionsfaktoren ablaufen könnte.

### 1.5.7 Weitere Funktionen der FOXO-Transkriptionsfaktoren

Die FOXOs tragen durch die Entgiftung von ROS zur Resistenz gegen oxidativen Stress bei (Abbildung 8). Während der Energiegewinnung in aerob lebenden Zellen entstehen aus Sauerstoff ROS, die den zellulären Strukturen oder anderen Molekülen schaden können. Die ROS können durch eine Vielzahl von Enzymen, wie zum Beispiel der MnSOD (**M**angansuperoxiddismutase) und der Katalase unschädlich gemacht werden (Koolman and Roehm, 2003). Die FOXOs sind nun in der Lage die MnSOD und die Katalase transkriptional zu aktivieren und damit zum Schutz vor oxidativem Stress beizutragen (Kops et al., 2002a; Yanase et al., 2002).

Eine weitere Rolle kommt den FOXOs im Glukose-Metabolismus zu (Abbildung 8). Sie aktivieren die Gene, die für die katalytische Untereinheit der G6P (**G**lukose-**6**-**P**hosphatase) sowie für die PEPCK (**P**hosphoenolpyruvat-Carboxykinase) kodieren (Nakae et al., 2001; Schmoll et al., 2000; Yeagley et al., 2001). Diese Enzyme katalysieren wichtige Reaktionen bei der Neusynthese von Glukose, der Glukoneogenese. Da Insulin über den Insulin/PI3K/PKB-Signalweg letztendlich u. a. die Phosphorylierung und somit Hemmung der FOXOs bewirkt, können diese Enzyme nicht mehr induziert werden. So werden die inhibitorischen Effekte von Insulin auf die Glukoneogenese u.a. durch die Repression der FOXOs vermittelt.



**Abbildung 8: Die wesentlichen Funktionen der FOXO-Transkriptionsfaktoren mit den entsprechenden Zielgenen.** Die FOXOs sind über die Regulation von Zielgenen in vielen zellulären Programmen reguliert. Neben den hier dargestellten Funktionen werden weitere in verschiedenen Übersichtsartikeln näher betrachtet (Greer and Brunet, 2005; Daitoku and Fukamizu, 2007).

FOXO-Transkriptionsfaktoren aktivieren auch Gene, die eine Rolle bei der DNA-Reparatur spielen (Abbildung 8). So induziert FOXO3a direkt *GADD45a* (growth arrest and DNA damage response gene), das für ein Protein kodiert, welches den G2/M-Arrest bewirkt, um die DNA-Reparatur zu ermöglichen (Tran et al., 2002). DDB1 (damage-specific DNA-binding protein), das spezifisch DNA-Läsionen erkennt und an diese Stellen bindet, wird ebenfalls positiv durch die FOXOs reguliert (Tran et al., 2002). Neben den hier angesprochenen Funktionen sind die FOXO-Transkriptionsfaktoren noch in etlichen anderen zellulären Prozessen involviert, die für diese Doktorarbeit jedoch nicht von Relevanz waren (Daitoku and Fukamizu, 2007; Greer and Brunet, 2005).

## 1.6 Zielsetzung

E2F-1 gehört zur Gruppe der E2F-Transkriptionsfaktoren, deren bekannteste Funktion in der Regulation des Zellzyklus liegt. In den vergangenen Jahren wurden in vielen Studien E2F-1-Zielgene ermittelt, die im Verlauf des Zellzyklus durch E2F-1 reguliert werden. Im Vorfeld meiner Doktorarbeit wurden mit Hilfe eines cDNA-Microarrays mehrere, bisher unbekannte, onkogene Zielgene von E2F-1 identifiziert. Darüber hinaus konnten einige Gene, darunter das Onkogen *BMII* und die Tumorsuppressorgene *FOXO1* und *FOXO3a*, als direkte Ziele einer transkriptionalen Regulation durch E2F-1 in Neuroblastomzellen verifiziert werden.

*BMII* kodiert ein Polycomb-Protein, das als Repressor in vielen zellulären Programmen involviert ist. So hemmt BMI1 nicht nur die *HOX*-Gene und den antiproliferativen *INK4A/ARF*-Lokus, sondern ist auch essentiell für die Erhaltung des proliferativen Potentials von Stammzellen und liegt in vielen verschiedenen Tumorarten dereguliert vor.

Die von *FOXO1* und *FOXO3a* kodierten Proteine gehören zur Forkhead-Familie von Transkriptionsfaktoren. Zwei Hauptfunktionen der FOXOs bestehen in der Förderung des Zellzyklusarrestes und der Induktion der Apoptose. Ursprünglich wurden sie identifiziert, da chromosomale Translokationen in Tumoren die *FOXO*-Gene betrafen. Dies legte schon eine grundlegende Bedeutung der FOXOs bei der Verhinderung der Krebsentstehung nahe.

BMI1 und die FOXOs waren aufgrund ihrer zellulären Funktionen und ihrer Rollen in Tumoren, als Onkogen bzw. Tumorsuppressorgene, von besonderem Interesse für weitergehende Untersuchungen ihrer Regulation durch E2F-1. Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollten deshalb im Wesentlichen zwei Fragestellungen bearbeitet werden:

1. Unter welchen Bedingungen werden *BMII*, *FOXO1* und *FOXO3a* durch E2F-1 reguliert?
2. Welche Rolle spielen BMI1 und die FOXOs für die Funktionen von E2F-1?

Dazu sollte die Regulation von *BMII* und den *FOXOs* durch E2F-1 in verschiedenen Zellsystemen, unter verschiedenen Bedingungen und bei unterschiedlichen, zellulären Prozessen untersucht werden.

## 2 MATERIALIEN

### 2.1 Zelllinien, verwendete Medien und Antibiotika

#### 2.1.1 Säugerzelllinien

SH-EP	humane Neuroblastomzelllinie freundlicherweise von M. Schwab (DKFZ Heidelberg) zur Verfügung gestellt
SH-EP-EH	SH-EP, die stabil den ekotropen Rezeptor exprimieren und das <i>Hygromycin</i> -Resistenzgen besitzen
IMR-32	humane Neuroblastomzelllinie freundlicherweise von M. Schwab (DKFZ Heidelberg) zur Verfügung gestellt
Phoenix <sup>ECO</sup> (PHX)	humane Verpackungszelllinie für rekombinante, ekotrope Retroviren von HEK-293-Zellen abstammend (Grignani et al., 1998)
HEK-293	humane embryonale Nierenzellen
T98G	humane Glioblastomzelllinie freundlicherweise von AG Gaubatz (Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt
WI-38	humane, diploide Fibroblasten aus der Lunge freundlicherweise von AG Elsässer (Universität Marburg) zur Verfügung gestellt
BJ	humane, diploide Fibroblasten aus der Vorhaut freundlicherweise von AG Gaubatz (Universität Würzburg) zur

---

	Verfügung gestellt
BJ-EH	BJ, die stabil den ekotropen Rezeptor exprimieren und das <i>Hygromyzin</i> -Resistenzgen besitzen
U2OS	humane Osteosarkomzelllinie (ATCC)
U2OS-EH	U2OS, die stabil den ekotropen Rezeptor exprimieren und das <i>Hygromyzin</i> -Resistenzgen besitzen
U2OS E2F-1-ER	U2OS-EH mit stabil integriertem <i>E2F-1-ER</i> -Gen und <i>Neomycin</i> -Resistenzgen
HeLa	humane Zervix-Karzinom-Zelllinie (ATCC)
HeLa-EH	HeLa, die stabil den ekotropen Rezeptor exprimieren und das <i>Hygromyzin</i> -Resistenzgen besitzen
NIH3T3	immortalisierte Mausembryofibroblasten (ATCC)
NIH3T3 E2F-1-ER	NIH3T3 mit stabil integriertem <i>E2F-1-ER</i> -Gen und <i>Neomycin</i> -Resistenzgen
primäre MEFs	primäre Mausembryofibroblasten (präpariert von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe aus Wildtyp-Mäusen am Embryonaltag 13,5)
PC12	Pheochromozytomzelllinie aus der Ratte freundlicherweise von S. Roßner (Universität Leipzig) zur Verfügung gestellt

Verschiedene weitere Derivate der Zelllinie SH-EP, die von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe etabliert und in dieser Doktorarbeit verwendet wurden, sind im Ergebnisteil näher beschrieben.

### 2.1.2 Für die Zelllinien verwendete Medien und Antibiotika

Zur Kultivierung der verschiedenen Zelllinien wurden unterschiedliche Medien und Seren genutzt, die in Tabelle 1 zusammengefasst sind.

**Tabelle 1: Auflistung der für die verschiedenen Zelllinien genutzten Medien, Seren und deren Anteil.** FBS...fötales Rinderserum (fetal bovine serum). CS...Kälberserum (calf serum). PS...Pferdeserum.

Zelllinie	Medium	Serum	Anteil Serum (% (v/v))
SH-EP	RPMI-1640	FBS	10
IMR-32	RPMI-1640	FBS	10
PHX	DMEM	FBS	10
T98G	DMEM	FBS	10
WI-38	MEM	FBS	10
BJ	DMEM	FBS	10
U2OS	DMEM	FBS	10
HeLa	DMEM	FBS	10
NIH3T3	DMEM	CS	5
primäre MEFs	DMEM	FBS	10
PC12	RPMI-1640	PS und FBS	10 bzw. 5

Den Medien wurde darüber hinaus stets 1% (v/v) Penizillin/Streptomycin (je 10.000 U, PAA) zugesetzt. RPMI-1640 und DMEM (beide Lonza, früher Cambrex) enthielten bereits L-Glutamin (584 mg/l). Zu MEM (Invitrogen, früher Gibco) wurde 1% (v/v) L-Glutamin (200 mM in 0,85% NaCl, Lonza) und 1% (v/v) Natriumpyruvat (100 mM, Invitrogen, früher Gibco) zugesetzt.

Die in Tabelle 2 dargestellten Konzentrationen der Antibiotika wurden für die erste Selektion nach Transfektion oder Infektion dieser Zellen verwendet. Für die Selektion auf ein *Neomycin*-Resistenzgen wurde das Neomycin-Analogon G418 verwendet.

**Tabelle 2: Verwendete Konzentrationen der Antibiotika im Medium der verschiedenen Zelllinien zur initialen Selektion nach Infektion oder Transfektion.**

Zelllinien	verwendete Endkonzentrationen im Medium			
	Puromycin (µg/ml)	G418 (µg/ml)	Hygromycin B (µg/ml)	Zeozin (µg/ml)
SH-EP	1	500	100	100
BJ	1	300	-	-
U2OS	1	600	200	-
HeLa	1	-	500	-
NIH3T3	1	600	-	-



Puromyzin (10 mg/ml) und Zeozin (100 mg/ml) wurden von der Firma InvivoGen und Hygromyzin B (406 mg/ml) und G418-Sulfat-Pulver von der Firma Calbiochem bezogen. Das G418-Sulfat-Pulver wurde in sterilem aqua bidest. gelöst und auf eine Konzentration von 200 mg/ml verdünnt. 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) und Doxyzyklin (Dox), das ein Tetrazyklin-Analogon ist und aufgrund geringerer Toxizität anstelle von Tetrazyklin verwendet wurde, stammten von Sigma und wurden in Ethanol abs. gelöst. Die eingesetzte Endkonzentration von 4-OHT im Medium betrug 200 nM oder 5 nM und die von Doxyzyklin stets 1 µg/ml.

## 2.2 DNA

Die verwendeten Primer und DNA-Oligonukleotide wurden von Metabion synthetisiert. Alle Plasmide, sofern nicht anders angegeben, wurden von Werner Lutz oder der Arbeitsgruppe Eilers zur Verfügung gestellt.

### 2.2.1 Primer

In Tabelle 3 sind alle für diese Doktorarbeit genutzten Primer aufgelistet. Entworfen wurden sie mit Hilfe des Universal ProbeLibrary Assay Design Centers von Roche Applied Science. Wenn möglich wurden die Primer so gewählt, dass bei der PCR eine Exon-Intron-Grenze überschritten wurde, um so die Amplifikation von genomischer DNA zu verhindern. Die Spezies des amplifizierten Gens und die Verwendung der Primer sind ebenfalls dargestellt.

**Tabelle 3: Zusammenstellung der verwendeten Primer mit Angabe der Spezies des amplifizierten Gens, Sequenz der Primer und ihrer Verwendung.** for...forward Primer. rev...reverse Primer. qRT-PCR...quantitative Realtime-PCR (quantitative Echtzeit-PCR). sq-PCR...semiquantitative PCR.

Bezeichnung	Spezies	Sequenz 5' -> 3'	Verwendung
<i>BIM for</i>	<i>Homo sapiens</i>	AGTTGCGGCGTATCGGAGAC	qRT-PCR
<i>BIM rev</i>	<i>Homo sapiens</i>	CCACACCAGGCGGACAATG	qRT-PCR
<i>BMI1 for</i>	<i>Homo sapiens</i>	AATTAGTTCAGGGCTTTTCAA	qRT-PCR
<i>BMI1 rev</i>	<i>Homo sapiens</i>	CTTCATCTGCAACCTCTCCTCTAT	qRT-PCR
<i>CCNA2 for</i>	<i>Homo sapiens</i>	GGTACTGAAGTCCGGGAACC	qRT-PCR
<i>CCNA2 rev</i>	<i>Homo sapiens</i>	GAAGATCCTTAAGGGGTGCAA	qRT-PCR
<i>CCNE1 for</i>	<i>Homo sapiens</i>	AGACGGGGAGCTCAAACTG	qRT-PCR

<i>CCNE1 rev</i>	<i>Homo sapiens</i>	CGGCCCCGCTGCTCTGCTTCTTA	qRT-PCR
<i>CS for</i>	<i>Homo sapiens</i>	AGTGCCCTTTCCGACCCTTACCTG	qRT-PCR
<i>CS rev</i>	<i>Homo sapiens</i>	GGATTCTTGGCTTTACCCTGCTCT	qRT-PCR
<i>dnFOXO</i>	<i>Homo sapiens</i>	TCGAGTTCTTCCATCCTGCT	sq-PCR
<i>FOXO1 for</i>	<i>Homo sapiens</i>	TGGTCAAGAGCGTGCCCTACT	qRT-PCR
<i>FOXO1 rev</i>	<i>Homo sapiens</i>	CCCGCTCTTGCCACCCTCTG	qRT-PCR
<i>FOXO3a for</i>	<i>Homo sapiens</i>	TGCTAAGCAGGCCTCATCTC	qRT-PCR
<i>FOXO3a rev</i>	<i>Homo sapiens</i>	CTTGTGTGAGTTTGAGGGTCTG	qRT-PCR
<i>OS-9 for</i>	<i>Homo sapiens</i>	ACCGAGACCGGCTCCGTTTCG	qRT-PCR
<i>OS-9 rev</i>	<i>Homo sapiens</i>	TGCCCCGATCCCCGCTCTGACTC	qRT-PCR
<i>PCNA for</i>	<i>Homo sapiens</i>	CGGATACCTTGCGCTAGTA	qRT-PCR
<i>PCNA rev</i>	<i>Homo sapiens</i>	TCCATCAACTTCATTTCATAGTCTG	qRT-PCR
<i>PKNOX1 for</i>	<i>Homo sapiens</i>	CACAGGGCTCTGAAGGCACAA	qRT-PCR
<i>PKNOX1 rev</i>	<i>Homo sapiens</i>	ATGAATGCGCAAAACCTGGATTG	qRT-PCR
<i>RCOR for</i>	<i>Homo sapiens</i>	TTGGCATGTTGGTCTGGTCAC	qRT-PCR
<i>RCOR rev</i>	<i>Homo sapiens</i>	TTTCTTTGGCAATGGCAATGTAT	qRT-PCR
<i>RPS14 for</i>	<i>Homo sapiens</i>	GGCAGACCGAGATGAATCCTCA	qRT-PCR
<i>RPS14 rev</i>	<i>Homo sapiens</i>	CAGGTCCAGGGGTCTTGGTCC	qRT-PCR
<i>RYBP for</i>	<i>Homo sapiens</i>	GGTTTTGGGATTGTAGCGTCTG	qRT-PCR
<i>RYBP rev</i>	<i>Homo sapiens</i>	GGGTGGTGGGGTGGCATACT	qRT-PCR
<i>SOCS1 for</i>	<i>Homo sapiens</i>	CCCCTCCGGCTGGCCCCTTCTGTA	qRT-PCR
<i>SOCS1 rev</i>	<i>Homo sapiens</i>	CCGTCGGGGCTCTGCTGCTGTGGA	qRT-PCR
<i>ZNF22 for</i>	<i>Homo sapiens</i>	CCCAGCGAGCCAGAGTGG	qRT-PCR
<i>ZNF22 rev</i>	<i>Homo sapiens</i>	CTTGGCTTGAGCTCCGAGAA	qRT-PCR
<i>Bmi1 for</i>	<i>Mus musculus</i>	AATTAGTCCCAGGGCTTTTCAA	qRT-PCR
<i>Bmi1 rev</i>	<i>Mus musculus</i>	TCTTCTCCTCATCTGCAACTTCTC	qRT-PCR
<i>Ccna2 for</i>	<i>Mus musculus</i>	GCCTTCACTCATTGCTGGAG	qRT-PCR
<i>Ccna2 rev</i>	<i>Mus musculus</i>	TGTTGTGCCAATGACTCAGG	qRT-PCR
<i>Ccnd2 for</i>	<i>Mus musculus</i>	ATTTC AAGTGCGTGCAGAAG	qRT-PCR
<i>Ccnd2 rev</i>	<i>Mus musculus</i>	ACACTTCTGTTTCTCACAGACCT	qRT-PCR
<i>Ccne1 for</i>	<i>Mus musculus</i>	CTGAGAGATGAGCACTTTCTGC	qRT-PCR
<i>Ccne1 rev</i>	<i>Mus musculus</i>	TGGAGCTTATAGACTTCGCACA	qRT-PCR
<i>Foxo1 for</i>	<i>Mus musculus</i>	GCTGGGTGTCAGGCTAAGAG	qRT-PCR
<i>Foxo1 rev</i>	<i>Mus musculus</i>	GCATCTTTGGACTGCTCCTC	qRT-PCR
<i>Foxo3a for</i>	<i>Mus musculus</i>	GATAAGGGCGACAGCAACAG	qRT-PCR
<i>Foxo3a rev</i>	<i>Mus musculus</i>	CTGTGCAGGGACAGGTTGT	qRT-PCR
<i>Ink4a for</i>	<i>Mus musculus</i>	AACGCCCCGAACCTTTTC	qRT-PCR
<i>Ink4a rev</i>	<i>Mus musculus</i>	GTGAACGTTGCCCATCATC	qRT-PCR
<i>Rps16 for</i>	<i>Mus musculus</i>	AGGAGCGATTTGCTGGTGTG	qRT-PCR
<i>Rps16 rev</i>	<i>Mus musculus</i>	GCTACCAGGGCCTTTGAGAT	qRT-PCR
<i>HA-Tag</i>	<i>synthetisch</i>	TACCCATACGATGTTCCAGATTAC	sq-PCR

### 2.2.2 DNA-Oligonukleotide

*shBMI1 7*

5'- GAT CCC TGA TGC CAC AAC CAT AAT ATT CAA GAG ATA TTA TGG  
TTG TGG CAT CAT TTT TGG AAA -3'

*shBMI1 8*

5'- AGC TTT TCC AAA AAT GAT GCC ACA ACC ATA ATA TCT CTT GAA TAT  
TAT GGT TGT GGC ATC AGG -3'

*shBMI1 9*

5'- GAT CCC ATA CTC CTA TGG ACG TTA ATT CAA GAG ATT AAC GTC CAT  
AGG AGT ATT TTT TGG AAA -3'

*shBMI1 10*

5'- AGC TTT TCC AAA AAA TAC TCC TAT GGA CGT TAA TCT CTT GAA TTA  
ACG TCC ATA GGA GTA TGG -3'

### 2.2.3 Plasmide

#### Basis- bzw. Leervektoren

pcDNA3	eukaryotischer Expressionsvektor mit Cytomegalie virus- (CMV) und T7-Promotor (Invitrogen)
pcDNA4/TO	eukaryotischer Expressionsvektor mit zwei Tet-Operator-Sequenzen im CMV-Promotor und <i>Zeozin</i> -Resistenzgen
pcDNA6/TR	eukaryotischer Expressionsvektor mit CMV-Promotor und dem Gen, das für den Tet-Repressor kodiert
pSUPER	eukaryotischer Vektor zur Expression von <i>shRNA</i> -

## Sequenzen

pTER	eukaryotischer Vektor zur Expression von <i>shRNA</i> -Sequenzen und <i>Zeozin</i> -Resistenzgen abgesehen von zusätzlicher <i>Tet-Operator</i> -Sequenz ist Promotor identisch zu pSUPER (van de Wetering et al., 2003)
pBABE <i>PURO</i>	Vektor für die Herstellung rekombinanter Retrovi- ren mit zusätzlichem <i>Puromyzin</i> -Resistenzgen (Morgenstern and Land, 1990)
pBABE <i>HYGRO</i>	Vektor für die Herstellung rekombinanter Retrovi- ren mit zusätzlichem <i>Hygromyzin</i> -Resistenzgen (Morgenstern and Land, 1990)
pWZL <i>NEO</i>	Vektor für die Herstellung rekombinanter Retrovi- ren mit zusätzlichem <i>Neomyzin</i> -Resistenzgen (Morgenstern and Land, 1990)
pGL3 basic	Luziferase-Reportervektor zur Klonierung von be- liebigen Promotoren vor das Luziferase-Gen (Promega)

Expressionsplasmide

<i>FOXO1luc</i>	siehe pGL3 <i>FOXO1</i> -Promotor
pCMV <i>lacZ</i>	Vektor zur Expression des bakteriellen Gens <i>lacZ</i> , das für die $\beta$ -Galaktosidase kodiert wird zur Normalisierung von Luziferase-Reporter assays verwendet

pCMV <i>HA-ER-E2F-1 NEO</i>	Expressionsvektor mit einem CMV-Promotor und humaner cDNA von E2F-1, Sequenz für den HA-Tag und für die modifizierte Östrogenrezeptorbindungsdomäne der Maus sowie <i>Neomycin</i> -Resistenzgen (Littlewood et al., 1995; Vigo et al., 1999)
pCMV <i>E2F-1-ER</i>	Expressionsvektor mit CMV-Promotor und humaner E2F-1 cDNA ligiert mit der Sequenz für den Östrogenrezeptor zur Verfügung gestellt von Kristian Helin
pCMV <i>E2F-1-ER 1-374</i>	pCMV E2F-1-ER mit humaner E2F-1 cDNA, die nur für die ersten 374 Aminosäurenreste kodiert zur Verfügung gestellt von Kristian Helin
pCMV <i>E2F-1-ER E132</i>	pCMV E2F-1-ER mit humaner mutierter E2F-1 cDNA, die E2F-1 mit wobei eine Mutation zur Verfügung gestellt von Kristian Helin
pcDNA4/TO <i>BMI1-ΔRF</i>	pcDNA4/TO mit der Sequenz, die für BMI1 ohne die Ringfinger-Domäne kodiert kloniert von Daniel Fehr (ehemaliges Mitglied der Arbeitsgruppe)
pcDNA4/TO <i>AFX-DB</i>	pcDNA4/TO mit dem Gen zur Expression der DNA-Bindungsdomäne von FOXO4 (AFX), auch bezeichnet als dominant-negatives FOXO kloniert von Katrin Killmer (ehemaliges Mitglied der Arbeitsgruppe)
pSUPER <i>shScrambled</i>	pSUPER zur Expression einer <i>shRNA</i> -Sequenz, die weder gegen ein Gen der Maus noch des Menschen gerichtet ist

kloniert von Sandra Bernard (ehemaliges Mitglied der Arbeitsgruppe)

pSUPER *shBMI1* 1/2

pSUPER zur Expression einer *shRNA*-Sequenz, die gegen humanes BMI1 gerichtet ist  
kloniert von Kornelius Kerl (ehemaliges Mitglied der Arbeitsgruppe) durch Insertion der hybridisierten DNA-Oligonukleotide *shBMI1 1* und *shBMI1 2*

pSUPER *shBMI1* 3/4

pSUPER zur Expression einer *shRNA*-Sequenz, die gegen humanes BMI1 gerichtet ist  
kloniert von Kornelius Kerl (ehemaliges Mitglied der Arbeitsgruppe) durch Insertion der hybridisierten DNA-Oligonukleotide *shBMI1 3* und *shBMI1 4*

pSUPER *shBMI1* 5/6

pSUPER zur Expression einer *shRNA*-Sequenz, die gegen humanes BMI1 gerichtet ist  
kloniert von Kornelius Kerl (ehemaliges Mitglied der Arbeitsgruppe) durch Insertion der hybridisierten DNA-Oligonukleotide *shBMI1 5* und *shBMI1 6*

pTER *shBMI1* 5/6

pTER zur Expression einer *shRNA*-Sequenz, die gegen humanes BMI1 gerichtet ist  
kloniert von Kornelius Kerl (ehemaliges Mitglied der Arbeitsgruppe) durch Insertion der hybridisierten DNA-Oligonukleotide *shBMI1 5* und *shBMI1 6*

pTER *shBMI1* 7/8

pTER zur Expression einer *shRNA*-Sequenz, die gegen humanes BMI1 gerichtet ist  
kloniert von mir durch Insertion der hybridisierten DNA-Oligonukleotide *shBMI1 7* und *shBMI1 8*

pTER *shBMI1* 9/10

pTER zur Expression einer *shRNA*-Sequenz, die gegen humanes BMI1 gerichtet ist

kloniert von Christine Gessner (ehemaliges Mitglied der Arbeitsgruppe) durch Insertion der hybridisierten DNA-Oligonukleotide *shBM11 9* und *shBM11 10*

pGL3 *FOXO1*

pGL3 basic mit *FOXO1*-Promotor vor dem Luciferase-Gen

kloniert von Christine Gessner (ehemaliges Mitglied der Arbeitsgruppe)

auch bezeichnet als *FOXO1luc*

### Retrovirale Plasmide

pBABE *PURO E1A wt*

pBABE *PURO* mit cDNA von *Wildtyp-E1A (12S)*

kloniert von Manuela Schader (ehemaliges Mitglied der Arbeitsgruppe)

pBABE *PURO E1A mut*

pBABE *PURO* mit cDNA, die mutiertes E1A (12S) kodiert, dass an Aminosäurepositionen 124 und 135 Alanin besitzt

kloniert von Manuela Schader (ehemaliges Mitglied der Arbeitsgruppe)

pBABE *H2B-GFP*

pBABE *PURO*, bei dem das *Puromycin*-Resistenzgen durch das Gen für die Expression von an Histon H2B-gekoppeltem eGFP ausgetauscht wurde zur Kontrolle der Infektionseffizienz

pBABE *PURO HA-ER-E2F-1*

pBABE *PURO* mit dem Gen zur Expression von *HA-ER-E2F-1* aus pCMV *HA-ER-E2F-1 NEO* (Vigo et al., 1999)

zur Verfügung gestellt von Kristian Helin

pBABE *PURO AFX-DB*

pBABE *PURO* mit dem Gen zur Expression der

	DNA-Bindungsdomäne von FOXO4 (AFX), auch bezeichnet als dominant-negatives FOXO
pBABE <i>HYGRO EcoR</i>	pBABE <i>HYGRO</i> mit dem Gen zur Expression des ekotropen Rezeptors
pBABE <i>HYGRO INK4A</i>	pBABE <i>HYGRO</i> mit humaner cDNA von <i>INK4A</i>
pWZL <i>NEO EcoR</i>	pWZL <i>NEO</i> mit dem Gen zur Expression des ekotropen Rezeptors
pWZL <i>NEO HA-ER-E2F-1</i>	pWZL <i>NEO</i> mit dem Gen zur Expression von <i>HA-ER-E2F-1</i> aus pCMV <i>HA-ER-E2F-1 NEO</i> kloniert von Christine Gessner (ehemaliges Mitglied der Arbeitsgruppe) und mir

## 2.3 Antikörper

### 2.3.1 Primäre Antikörper

anti- $\beta$ -Aktin	monoklonaler Mausantikörper IgG1 der $\beta$ -Aktin aus dem Menschen, der Maus und der Ratte erkennt (Sigma, AC-15) Verdünnung 1:10000 im Western Blot
anti-BMI1	monoklonaler Mausantikörper IgG1 der BMI1 aus dem Menschen, der Maus und der Ratte erkennt (Upstate Biotechnology, 229F6) Verdünnung 1:1000 im Western Blot
anti- $\beta$ -Tubulin	monoklonaler Mausantikörper IgG2b der $\beta$ -Tubulin aus dem Menschen erkennt (Chemicon, MAB3408)



Verdünnung 1:6000 im Western Blot

anti-CDK2

polyklonaler Kaninchenantikörper M2 der CDK2 aus dem Menschen erkennt (Santa Cruz, sc-163)

Verdünnung 1:1000 im Western Blot

anti-NGF- $\beta$

monoklonaler Mausantikörper IgG1 der NGF- $\beta$  aus dem Menschen erkennt (Sigma, 25623.1)

Verdünnung 1:100 in der Zellkultur

### **2.3.2 Sekundäre Antikörper**

anti-Kaninchen-HRP

Esel-anti-Kaninchen-Immunglobulin gekoppelt an die Meerrettich-Peroxidase (HRP, horseradish peroxidase) Affinitäts-gereinigter Antikörper (Amersham)

Verdünnung 1:3000 im Western Blot

anti-Maus-HRP

Esel-anti-Maus-Immunglobulin gekoppelt an die HRP Affinitäts-gereinigter Antikörper (Amersham)

Verdünnung 1:3000 im Western Blot

## **2.4 Chemikalien**

Abgesehen von einigen, gesondert aufgeführten, Ausnahmen wurden Chemikalien in Analysequalität oder in Qualität für die Molekularbiologie von den Firmen Sigma-Aldrich (München), Merck (Darmstadt), Roth, Acros Organics und Applichem (Heidelberg) verwendet. Von Sigma (Deisenhofen) und Invitrogen wurden Feinchemikalien mit höchstem Reinheitsgrad bezogen.

Difco

Bacto-Agar, Baktotrypton

Fluka	Adenosin-5'-triphosphat (ATP)
Sekam	Agarose für präparative Zwecke

## 2.5 Puffer, Lösungen und Medien

1kb DNA-Marker:	1 ml 1 µg/µl 1kb DNA-Marker (Invitrogen) 333 µl DNA-Ladepuffer 6x 667 µl TE
β-Gal-Puffer:	25 mM Glyzyl-Glyzin pH 7,8 2 mM ATP pH 7,5 10 mM MgSO <sub>4</sub> 50 mM β-Mercaptoethanol in aqua bidest.
Blocklösung:	5% (w/v) Magermilchpulver in TBS-T
Bradford-Lösung:	100 ml 85% Phosphorsäure 47,5 ml Ethanol abs. 100 mg Coomassie Brilliant Blue G ad 1000 ml aqua bidest.
DEPC-Wasser:	100 µl DEPC ad 100 ml aqua bidest.
DNA-Ladepuffer 6x:	20 g Sucrose 0,1 g Bromphenolblau 0,1 g Xylencyanol 1 ml 0,5 M EDTA-Lösung ad 50 ml aqua bidest.

Einfriermedium:	35 ml Medium (mit Serum) 10 ml FBS 5 ml DMSO
Elutionspuffer (EB):	10 mM Tris-HCl pH 8,5 bezogen von Qiagen (RNase-frei)
Färbelösung für seneszente Zellen:	1 mg/ml X-Gal 120 $\mu$ M $K_3Fe(CN)_6$ 120 $\mu$ M $K_4Fe(CN)_6$ 1 mM $MgCl_2$ in PBS pH 6,0
HBS 2x:	280 mM NaCl 1,5 mM $Na_2HPO_4$ 50 mM HEPES in aqua bidest. pH 7,0 mit 1 M NaOH einstellen
Hybridisierungspuffer:	200 mM NaCl 100 mM HEPES pH 7,4
Kaliumphosphat-Puffer:	100 mM $K_2HPO_4$ pH 7,8 mit 500 mM $KH_2PO_4$ einstellen 1 mM DTT frisch zugeben
LB-Agar:	6 g Bacto-Agar ad 500 ml LB-Medium
LBA-Medium:	100 $\mu$ g/ml Ampizillin in LB-Medium
LB-Medium:	50 g Baktotrypton

	25 g Hefeextrakt 50 g NaCl ad 5000 ml aqua bidest.
Luziferase-Puffer:	25 mM Glyzyl-Glyzin pH 7,8 2 mM ATP pH 7,5 10 mM MgSO <sub>4</sub> in aqua bidest.
Luziferase-Substratlösung:	200 µM D-Luziferin 20 mM Glyzyl-Glyzin pH 7,8 in aqua bidest.
Lysepuffer:	50 mM Tris-HCl pH 8,0 150 mM NaCl 1% Triton X-100 1 mM DTT frisch zugeben 1:1000 Protease-Inhibitor-Mix frisch zugeben
PBS:	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,76 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> in aqua bidest.
Puffer A:	10 mM HEPES pH 7,9 10 mM KCl 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> 340 mM Sucrose 10% (v/v) Glycerol 1 mM DTT frisch zugeben 1:1000 Protease-Inhibitor-Mix frisch zugeben 0,1% NP40 frisch zugeben in aqua bidest.

Puffer B:	3 mM EDTA 200 $\mu$ M EGTA 1 mM DTT frisch zugeben 1:1000 Protease-Inhibitor-Mix frisch zugeben in aqua bidest.
Sammelgel 4%:	650 $\mu$ l 30% Acrylamid-Lösung 1,2 ml 0,5 M Tris-HCl pH 6,8 3 ml aqua bidest. 50 $\mu$ l 10% (w/v) SDS-Lösung 50 $\mu$ l 10% (w/v) APS-Lösung 5 $\mu$ l TEMED
SDS-Ladepuffer 3x:	3,75 ml 0,5 M Tris-HCl pH 6,8 3 ml Glycerol 600 mg SDS 3 mg Bromphenolblau 1,5 ml $\beta$ -Mercaptoethanol ad 10 ml aqua bidest.
SDS-Laufpuffer:	25 mM Tris-Base 250 mM Glycin 0,1% (w/v) SDS
STET-Puffer:	8% (w/v) Sucrose 50 mM EDTA 50 mM Tris pH 8,0 0,5% (v/v) Triton X-100 frisch zugeben 500 $\mu$ g/ml Lysozym frisch zugeben in aqua bidest.
TAE 1x:	Verdünnung von TAE-Puffer 50x mit aqua bidest.
TAE 50x:	2 M Tris

	5,7% (v/v) Essigsäure 50 mM EDTA pH 8,0 in aqua bidest.
TBS-T:	0,2% (v/v) Tween-20 25 mM Tris pH 7,4 140 mM NaCl in aqua bidest.
TE:	10 mM Tris pH 8,0 1 mM EDTA pH 8,0 in aqua bidest.
Transferpuffer:	112,9 g Glycin 30 g Tris-Base 30 ml 10% (w/v) SDS-Lösung ad 1000 ml aqua bidest.
Trenngel 15%	7,5 ml 30% Acrylamid-Lösung 3,75 ml 1,5 M Tris-HCl pH 8,8 3,6 ml aqua bidest. 150 µl 10% (w/v) SDS-Lösung 150 µl 10% (w/v) APS-Lösung 15 µl TEMED
Trypsinlösung:	100 ml 2,5% Trypsin in PBS (PAA) 900 ml PBS

## **2.6 Lysate aus primären Neuroblastomen**

Die verwendeten Proteinlysate aus primären Neuroblastomen wurden freundlicherweise von Holger Christiansen und Bernd Berwanger aus der Kinderklinik in Marburg zur Verfügung gestellt.

## **2.7 Gebrauchsmaterialien**

Gebrauchsmaterialien, wie zum Beispiel Reaktionsgefäße, Falkons oder Zellkulturschalen wurden von den Firmen Eppendorf, Greiner, Nunc, Sarstedt und Kimberly-Clark zur Verfügung gestellt.

## **2.8 Geräte, Membranen und Filme**

Schüttelinkubatoren, Model G25, New Brunswick Scientific Co. Inc

Sorvall® RC-5B Zentrifuge, DuPont Instruments

Zentrifuge 5417R, Eppendorff

Megafuge 1.0R, Heraeus

PCR-Gerät Primus 96 plus, MWG AG Biotech

qRT-PCR-Geräte: AbiPrism, 7000 Sequence Detection System, Applied Biosystems  
Mx 3000P™, Stratagene

Sterilarbeitsbank, HeraSafe, Heraeus

Begasungsbrutschrank BBD 6220, Heraeus

Mikroskop Axiovert25, Zeiss

Durchflußzytometer: FACS Calibur, BD Biosciences

Photometer: Ultrospec 2000 UV/visible Spectrophotometer, Pharmacia Biotech  
NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer

Transblot SD Apparatur, Bio-Rad

Luminometer Lumat LB9507, EG&G Berthold

Immobilon-P, PVDF Transfer Membran, Millipore

Whatman-Filterpapier, Gel-Blotting Papier, Schleicher und Schuell

ECL Hyperfilm, Amersham

BIOMAX MR Scientific Imaging Film, Kodak



## 3 METHODEN

### 3.1 Molekularbiologische Methoden

#### 3.1.1 Transformation von kompetenten Bakterien mit Plasmid-DNA und Plasmid-amplifikation

Kompetente *Escherichia coli*-Bakterien des Stammes DH-5 $\alpha$  wurden aufgetaut und 100  $\mu$ l zum Transformationsansatz vorsichtig pipettiert. Nach einer Inkubation auf Eis für ca. 20 Minuten folgte der Hitzeschock für 90 Sekunden bei 42°C. Dann wurde der Ansatz für 2 Minuten auf Eis inkubiert, bevor 1 ml LB-Medium hinzugegeben wurde. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße für 45 Minuten bei 37°C geschüttelt. Diente die Transformation der reinen Plasmidamplifikation wurde dann der gesamte Inhalt des Reaktionsgefäßes in einen 2-l-Kolben mit 400 ml LBA-Medium überführt. Erfolgte dagegen die Transformation eines Ligationsansatzes in die Bakterien, wurden die Reaktionsgefäße kurz anzentrifugiert und dann das Pellet mit wenig LB-Medium resuspendiert. Die so ankonzentrierten, transformierten *E. coli*-Bakterien wurden auf einer LBA-Platte (Schale auf der LB-Agar ausplattiert ist) ausgestrichen. Anschließend folgte in beiden Fällen eine Inkubation über Nacht bei 37°C unter Schütteln (2-l-Kolben) oder im Brutschrank (LBA-Platte) zur Plasmidamplifikation.

Bakterienkolonien die am nächsten Tag auf der LBA-Platte wuchsen, wurden in ein Reagenzglas mit 5 ml LBA-Medium überführt und für eine weitere Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert.

#### 3.1.2 Isolation der Plasmid-DNA aus Bakterien

Sollten durch die Plasmidamplifikation in Bakterien größere Mengen eines Plasmides synthetisiert werden (Maxi-Präparation von Plasmid-DNA), wurde die 400 ml Übernachtskultur gemäß den Angaben des Herstellers (JETSTAR 2.0 Plasmid Purification Maxi Kit, Genomed) weiter verarbeitet. Das am Ende erhaltene Plasmid-pellet wurde in TE gelöst, auf eine Konzentration von 1  $\mu$ g/ $\mu$ l eingestellt und anschließend bei -20°C gelagert.

Aus den 5 ml Übernachtskulturen wurde die Plasmid-DNA nach einem vereinfachten Verfahren in einer Mini-Präparation isoliert. Dazu wurden 1,5 ml Übernachtskultur in ein Reaktionsgefäß überführt und für 5 Minuten bei 4°C und 2500 x g zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in 110 µl STET-Puffer resuspendiert und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Probe für 1 Minute auf 95°C erhitzt. Es folgte eine Zentrifugation für 10 Minuten bei 4°C und 21.000 x g. Das Pellet wurde entfernt und zu der zurückgebliebenen Lösung wurden 110 µl Isopropanol gegeben und der Ansatz gut gemischt. Die Probe wurde dann für 5 Minuten bei 4°C und 21.000 x g zentrifugiert und das erhaltene Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen. Nachdem das Pellet getrocknet war, wurde die Plasmid-DNA in 25 µl TE gelöst.

### **3.1.3 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten**

Um verschiedene DNA-Fragmente zu analysieren und voneinander zu trennen, wurde die Agarosegelelektrophorese genutzt. Je nach erwarteter Größe der DNA-Fragmente wurde zunächst eine Lösung aus 1-2% (w/v) Agarose in 1x TAE aufgekocht. Nachdem die Lösung auf ca. 50°C abgekühlt war, wurde sie mit 30 µl/l 1%iger Ethidiumbromid-Lösung versetzt und in einen Gelträger mit eingesetztem Gelkamm gegossen. Das abgekühlte, ausgehärtete Gel wurde in eine Elektrophorese-Kammer gesetzt und diese mit 1x TAE gefüllt. Zur DNA-Lösung wurde ein Fünftel des Volumens an 6x DNA-Ladepuffer gegeben und anschließend alles in die Geltaschen pipettiert. Die Auftrennung erfolgte bei Anlegen von 80-120 V für 30 Minuten bis zu 2 Stunden. Das in die DNA interkalierte Ethidiumbromid fluoresziert bei Anregung mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm. So konnten die DNA-Fragmente im Gel sichtbar gemacht und anhand eines 1kb DNA-Markers ihre ungefähre Größe bestimmt werden.

### **3.1.4 DNA-Extraktion aus Agarosegel**

Wenn ein bestimmtes DNA-Fragment von anderen getrennt und gereinigt werden sollte, wurde die gelelektrophoretische Auftrennung genutzt. Das Gelstück, in dem sich das gewünschte DNA-Fragment befand, wurde mit einem Skalpell aus dem gesamten Agarosegel herausgeschnitten. Das DNA-enhaltene Gelstück wurde gewogen und dann

die DNA mittels eines Gelextraktionskits (Gel Extraction Kit, Qiagen) entsprechend den Angaben des Herstellers extrahiert und gereinigt.

### **3.1.5 Sequenz-spezifische Hydrolyse von DNA (Restriktionsverdau)**

Um DNA Sequenz-spezifisch zu schneiden, wurde sie in einem Ansatz mit der vom Hersteller empfohlenen Einheiten an Restriktionsendonukleasen (Invitrogen oder Fermentas) für 1-3 Stunden bei 37°C inkubiert. Dabei wurde ebenfalls der von den Herstellern, für das jeweilige Enzym, empfohlene Restriktionspuffer (Invitrogen oder Fermentas) verwendet. Bei gleichzeitiger Hydrolyse mit zwei Restriktionsendonukleasen wurde der Puffer genutzt, bei dem beide Enzyme ausreichend hohe katalytische Aktivitäten (siehe Herstellerangaben) zeigten.

Restriktionsansatz mit einem Enzym:    x µg DNA  
    x Einheiten Restriktionsendonuklease  
    1/10 Vol. 10x Restriktionspuffer  
    ad 10-30 µl aqua bidest.

Restriktionsansatz mit zwei Enzymen:    x µg DNA  
    x Einheiten Restriktionsendonuklease 1  
    x Einheiten Restriktionsendonuklease 2  
    1/10 Vol. 10x Restriktionspuffer  
    ad 20-40 µl aqua bidest.

Erfolgte ein analytischer Restriktionsverdau von Plasmid-DNA aus einer Mini-Präparation wurde dem Ansatz noch 1 µl RNase A (10 µg/µl) zugesetzt.

### **3.1.6. Hybridisieren von zwei DNA-Einzelsträngen**

DNA-Einzelstränge, die hybridisiert werden sollten, wurden mit Hybridisierungspuffer in ein Reaktionsgefäß gegeben und im Wasserbad für ca. 3 Minuten aufgeköcht. Dann wurde die Hitzezufuhr gestoppt und so ein langsames Abkühlen des Wasserbades und

somit auch der Probe ermöglicht. Nachdem die Probe auf unter 30°C abgekühlt war, wurde sie bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Hybridisierungsansatz:      3 µl (150 pmol) Oligonukleotid 1 (1 µg/µl, 50 pmol/µl)  
                                     3 µl (150 pmol) Oligonukleotid 2 (1 µg/µl, 50 pmol/µl)  
                                     25 µl Hybridisierungspuffer  
                                     16 µl aqua bidest.

### **3.1.7 Ligation**

Zur kovalenten Verknüpfung von DNA-Fragmenten wurde zu 50-200 ng des linearisierten Plasmids (Vektor) ein ca. 10facher molarer Überschuss an Insert (zu inserierendes DNA-Fragment) gegeben und diese in einem Ligationsansatz für 12-16 Stunden bei 16°C inkubiert.

Ligationsansatz:      50-200 ng linearisiertes Plasmid  
                                     X ng Insert  
                                     1 µl 10x T4-DNA-Ligasepuffer (New England Biolabs)  
                                     1 µl T4-DNA-Ligase (New England Biolabs)  
                                     ad 10 µl aqua bidest.

### **3.1.8 RNA-Isolation**

Je nach weiterer Verwendung wurde die RNA aus Zellen mittels TRIzol<sup>®</sup> Reagenz oder durch Nutzung des NucleoSpin<sup>®</sup>-Kits von Machery-Nagel isoliert. RNA, die nachfolgend zur cDNA-Synthese und dann für Analysen mittels quantitativer Realtime-PCR (qRT-PCR) genutzt werden sollte, wurde mittels TRIzol<sup>®</sup> Reagenz isoliert und aufgereinigt. Die Zellen wurden zunächst mit kaltem PBS gewaschen und anschließend mit einem Spatel in PBS abgeschabt. Durch Zentrifugieren für 5 Minuten bei 4°C und 400 x g wurden sie pelletiert und dann in 1 ml TRIzol<sup>®</sup> (für Zellen einer 10-cm-Schale) resuspendiert. Nach einer Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur folgte die Zugabe von 200 µl Chloroform und das gründliche Mischen durch Vortexen. Danach

wurde die Probe für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bevor sie für 10 Minuten bei 15.000 x g und 4°C zentrifugiert wurde. Die wässrige, obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µl Isopropanol zum Fällern versetzt. Nach einer Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Probe für 10 Minuten bei 21.000 x g und 4°C zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde mit 75% Ethanol in DEPC-Wasser gewaschen, getrocknet und in DEPC-Wasser gelöst. Zur Lagerung der RNA wurde der Probe 10% (v/v) 3 M Natriumacetat und das 2,5fache Volumen an Ethanol abs. zugesetzt und sie bei –80°C aufbewahrt.

Das Nucleospin®-Kit von Machery-Nagel wurde verwendet, wenn RNA besonders hoher Reinheit als Ausgangsmaterial für einen cDNA-Microarray benötigt wurde. Die Isolation und Aufreinigung der RNA erfolgte dabei nach Herstellerangaben.

### **3.1.9 cDNA-Synthese**

Die isolierte RNA kann in eine DNA-Kopie (cDNA, copy DNA) umgeschrieben werden. Die RNA dient dabei der Reversen Transkriptase als Matrize. Für die cDNA-Synthese wurden jeweils 2 µg RNA in 10 µl DEPC-Wasser vorgelegt. Durch Inkubation der Probe für 1 Minute bei 65°C und dann sofortiges Überführen auf Eis wurden Sekundärstrukturen aufgelöst. Danach wurde zu der Probe die Reaktionsmischung pipettiert. Anschließend wurden folgende Inkubationsschritte durchgeführt:

10 Minuten Raumtemperatur

50 Minuten 37°C

15 Minuten 70°C (Inaktivierung der Reversen Transkriptase)

Die Probe wurden dann bis zur weiteren Verwendung bei –20°C gelagert.

Reaktionsmischung:    10 µl 5x „First Strand Buffer“ (Invitrogen)  
                              5 µl 0,1 M DTT (Invitrogen)  
                              5 µl 2,5 mM dNTPs (Roth)  
                              2 µl 2 mg/ml Random-Primer p(dN)<sub>6</sub> (Roche)  
                              0,2 µl RNasin® Plus (Promega)  
                              1 µl 200 U/µl M-MLV Reverse Transkriptase (Invitrogen)

### 3.1.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion dient im Allgemeinen zur Amplifikation eines spezifischen DNA-Abschnittes. Hier wurde die PCR vor allem zur Quantifizierung der eingesetzten cDNA, die aus proportionalen Mengen RNA eines speziellen Gens synthetisiert wurde, verwendet.

#### Semiquantitative PCR

Zunächst wurde die PCR-Mischung für alle Proben angesetzt und aufgeteilt. Nachdem jeweils 1 µl der cDNA, die 40 ng RNA entsprach, zugegeben war, wurde die PCR mit folgendem Programm gestartet:

1 Zyklus	95°C für 3 Minuten
30 Zyklen	95°C für 30 Sekunden
	50°C für 50 Sekunden
	72°C für 50 Sekunden
1 Zyklus	72°C für 3 Minuten

Bei der semiquantitativen PCR wurde die Amplifikation unterbrochen, damit die Produktentstehung kein Plateau erreichen konnte. Dann wurden gleiche Volumina der PCR-Proben auf ein Agarose-Gel aufgetragen. Die gleiche Beladung des Gels und der Einsatz gleicher Mengen RNA für die cDNA-Synthese wurden durch das ribosomale Kalibratorgen *RPS14* (für den Menschen) überprüft. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung konnte über die Stärke der DNA-Banden eine Aussage zum Verhältnis der ursprünglich eingesetzten mRNA-Mengen eines Gens gemacht werden.

PCR-Mastermix:	10 µl RedTaq Polymerase-Puffer (Sigma)
	1 µl Primermix (je 10 pmol/µl)
	1 µl dNTPs (10 mM) (Roth)
	1 µl RedTaq (Sigma)
	ad 49 µl aqua bidest.

### Quantitative Realtime-PCR (qRT-PCR, quantitative Echtzeit-PCR)

Für die QRT-PCRs wurde das qPCR Core kit for SYBR<sup>®</sup> Green I von Eurogentec genutzt. Zunächst wurde der PCR-Mastermix vorgelegt und dann 1 µl cDNA zugegeben. Durch SYBR<sup>®</sup> Green konnten die entstehenden DNA-Fragmente detektiert werden. Das verwendete PCR-Programm enthielt folgende Inkubationsschritte:

1 Zyklus	95°C für 10 Minuten
40 Zyklen	95°C für 30 Sekunden
	60°C für 1 Minute
1 Zyklus	60°C für 1 Minute

Die Quantifizierung erfolgte entsprechend der relativen  $\Delta\Delta C_t$  Quantifizierungsmethode (Applied Biosystems User Bulletin #2), wobei die ribosomalen Gene *RPS14* in Menschen und *Rps16* in der Maus als Kalibratoren verwendet wurden. Für die Analysen von Proben aus Rattenzellen konnten aufgrund der hohen Homologie die entsprechenden Primer für Mausgene verwendet werden. Die PCR-Reaktionen wurden in Duplikaten oder Triplikaten durchgeführt, wobei für die Triplikate anschließend die Standardabweichung nach dem Gaußsschem Fehlerfortpflanzungsgesetz berechnet werden konnte.

PCR-Mastermix:	2,5 µl 10x Reaktionspuffer (Eurogentec)
	1,75 µl 50 mM MgCl <sub>2</sub> (Eurogentec)
	1 µl 5 mM dNTPs (Eurogentec)
	0,5 µl Primermix (je 10 pmol/µl)
	0,75 µl SYBR <sup>®</sup> Green-Lösung (Eurogentec)
	0,125 µl Hot Goldstar Enzym (Eurogentec)
	ad 24 µl Elutionspuffer (Qiagen)

### **3.1.11 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA**

Die Konzentrationen von DNA und RNA wurde mittels NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer durchgeführt. Zur Berechnung wurde dabei die Absorption von 1 µl einer Probe bei 260 nm für DNA und bei 280 nm für RNA verwendet.

### **3.1.12 cDNA-Microarray**

Der cDNA-Microarray wurde von der Microarray-Serviceeinheit des IMT durchgeführt. Dabei wurden jeweils 55 µg RNA zunächst in cDNA revers transkribiert, aufgereinigt und anschließend mit den Fluoreszenzfarbstoffen Cy3 und Cy5 markiert. Die fluoreszierenden cDNA-Proben wurden aufgereinigt und über Nacht zwischen zwei cDNA-Microarray-Chips gegeben (Sandwich). Auf diesen Chips befanden sich 11.552 einzelsträngige, humane cDNAs, die mit entsprechenden fluoreszenz-markierten cDNA-Proben hybridisieren konnten. Nach dem Waschen der Chips wurden die Daten eingelesen und von Birgit Samans ausgewertet.

## **3.2 Zellbiologische Methoden**

Die Zellen wurden während der Kultivierung und den Versuchen stets in einem Inkubator (Begasungsbrutschrank) BBD 6220 von Heraeus bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> gelagert.

### **3.2.1 Auftauen von Zellen**

Die tiefgefrorenen Zellen wurden schnell im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Die Zellen eines Kryogefäßes wurden dann in 10 ml kalten Mediums überführt und für 5 Minuten bei 150 x g und 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in kaltem Medium aufgenommen und in eine Zellkulturschale gegeben.



### **3.2.2 Passagieren von Zellen und Serumentzug**

Während der Kultivierung proliferierten die Zellen und bildeten meist eine eindimensionale Schicht am Boden der Zellkulturschalen. War der Boden fast komplett mit Zellen bedeckt, mussten die Zellen auf mehrere neue Schalen aufgeteilt werden. Dazu wurde das Medium gründlich abgesaugt und bei besonders adhärenen Zellen wurde ein Waschschrift mit PBS durchgeführt. Dann wurde 1 ml Trypsinlösung je 10-cm-Zellkulturschale auf die Zellen gegeben und bei Raumtemperatur inkubiert, bis sich die Zellen vom Boden der Schale lösten. Mit Medium bzw. dem darin enthaltenen Serum wurde die Trypsinreaktion gestoppt. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren der Zellen wurden sie vereinzelt. Bei Bedarf wurden die Zellen dann in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Ein Teil der Zellen wurde anschließend in eine neue Zellkulturschale gegeben. Die Anzahl der Zellen, die jeweils passagiert oder für einen Versuch ausplattiert wurde, richtete sich nach der Größe der Zellen, der Proliferationszeit und der Art des durchzuführenden Experimentes.

Bei einem Serumentzug werden den Zellen alle nötigen Wachstumsfaktoren vorenthalten, so dass sie den Zellzyklus verlassen und in die G0- oder Ruhephase eintreten. Dazu wurde zunächst das Serum-enthaltene Medium der Zellen abgesaugt und dann gründlich mit PBS gewaschen. Die Zellen bekamen anschließend neues Medium jedoch ohne Serum für eine vorgegebene Zeit.

### **3.2.3 Einfrieren von Zellen**

Die jeweiligen Zellen wurden mittels Trypsinlösung von der Zellkulturschale gelöst und durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 150 x g und 4°C pelletiert. Das Zellpellet wurde in ca. 2 ml Einfriermedium resuspendiert und auf zwei Kryogefäße verteilt. Diese wurden zunächst für 20 Minuten im Eisbad und dann für 1 Stunde bei -20°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Überführung zu -80°C, wo die Zellen für einen Tag bis mehrere Wochen gelagert wurden. Für die langfristige Lagerung wurden die Kryogefäße in einen Tank mit flüssigem Stickstoff überführt.

### 3.2.4 Transfektion von Plasmid-DNA in Säugerzellen

Um Plasmid-DNA in Säugerzellen einzubringen, wurde sie in Kalziumphosphat-Komplexe integriert, die leicht von Zellen aufgenommen werden.

Dazu wurden 24 Stunden vor der Transfektion die Zellen in 10-cm-Zellkulturschalen ausplattiert. Bei Zelllinien, die normalerweise in RPMI-1640-Medium kultiviert wurden, erfolgten direkt vor der Transfektion ein Waschschrift und der Wechsel zu DMEM-Medium. Dies war nötig, da Komponenten des RPMI-1640-Mediums in Verbindung mit den DNA-Kalziumphosphat-Komplexen ausfielen. Für die Transfektion wurde zunächst eine DNA-Kalziumchlorid-Mischung angesetzt. Dazu wurden unter Vortexen 500 µl 2x HBS zu der DNA-Kalziumchlorid-Mischung getropft, woraufhin sich Kalziumphosphat-Komplexe mit der DNA bildeten. Die fertige Lösung wurde langsam und gleichmäßig unter Schwenken der Schalen auf die Zellen gegeben. Nach 12-16 Stunden wurden die Zellen mit PBS gewaschen und je nach Art der Transfektion weiter behandelt.

DNA-Kalziumchlorid-Mischung:	410 µl autoklaviertes aqua bidest
	50 µl 2,5 M CaCl <sub>2</sub>
	40 µl Plasmid-DNA (1 µg/µl)

#### Transiente Transfektion

Eine vorübergehende (transiente) Transfektion wurde stets für kurze Versuche durchgeführt und wenn eine Mischung aus Zellen mit und ohne integrierter Plasmid-DNA genutzt werden konnte. Dazu wurden die Zellen nach der eigentlichen Transfektion und dem Waschschrift mit neuem Medium versehen und bis zum Versuchsende weiter kultiviert.

#### Stabile Transfektion

Bei einer stabilen Transfektion war das Ziel die stabile, längerfristige Integrierung der Plasmid-DNA in die genomische DNA der Empfängerzelle. Dazu wurden entweder

Plasmide verwendet, die ein Antibiotika-Resistenzgen besaßen, oder ein solches Plasmid wurde kotransfiziert. Bei Behandlung mit dem Antibiotika überlebten so nur die Zellen, die die Plasmid-DNA und somit das Resistenzgen stabil integriert hatten. Dann wurde entweder ein Misch- oder ein Einzelklon für die Experimente genutzt. Der Mischklon bestand aus einer Mischung von Zellen, die die Selektion mit dem Antibiotikum überlebt hatten. Bei einem Einzelklon entstammten alle Zellen aus einer einzelnen Mutterzelle, die die Selektion überlebt und dann durch Proliferation den Klon konstituiert hatte. Dazu wurden die Zellen, nach der Transfektion und dem Waschschrift, von der Schale abgelöst, gut resuspendiert und sehr stark verdünnt auf neue Schalen ausplattiert. So konnte durch Proliferation von vereinzelter Zellen ein Einzelklon entstehen. Dieser wurde unter Abgrenzung von den übrigen Klonen mittels Klonierungsring von der Schale gelöst und separat hochgezogen.

Die Selektion mit dem Antibiotikum wurde jeweils 24-48 Stunden nach Beginn der Transfektion gestartet. Zur Kontrolle wurde auch auf eine Schale mit Zellen, die nicht transfiziert worden waren oder nicht das Resistenzgen bekamen, das Antibiotikum gegeben. So konnte der Zeitpunkt der abgeschlossenen Selektion bestimmt werden.

### **3.2.5 Retrovirale Infektion**

Die Infektion mit Retroviren bietet neben der Transfektion eine zweite effiziente Möglichkeit, Plasmid-DNA stabil in Zellen zu integrieren (Pear et al., 1993). Voraussetzung dafür sind jedoch ekotrope Rezeptoren, über die die Retroviren an die Zellen binden und so dann aufgenommen werden. Maus- oder Rattenzellen besitzen von Natur aus ekotrope Rezeptoren. Dagegen musste zur Präsentation von ekotropen Rezeptoren durch menschliche Zellen erst das Gen für den ekotropen Rezeptor transfiziert werden.

#### Herstellen rekombinanter Retroviren

Hergestellt wurden die Viren in der Phoenix-Verpackungszelllinie, die von HEK-293-Zellen abstammt und stabil Gene exprimiert, die essentielle Komponenten für die Verpackung der Viren kodieren. Phoenix-Zellen wurden mit speziellen Konstrukten

transfiziert und produzierten daraufhin Retroviren mit den entsprechenden Genen. Expressionsgene wurden dafür in Konstrukte der pBABE- und pWZL-Gruppe kloniert (Morgenstern and Land, 1990). 24 Stunden vor Transfektion wurden 3 Millionen Phoenix-Zellen je 10-cm-Zellkulturschale ausplattiert. Mittels Kalziumphosphat-Methode wurden die entsprechenden Konstrukte transfiziert und 12-16 Stunden danach wurden die Zellen gut mit PBS gewaschen. Dann erhielten sie 7 ml neues Medium. Der erste Virusüberstand wurde ca. 48 Stunden nach Beginn der Transfektion geerntet. Dazu wurde das Phoenix-Medium in 15-ml-Falkons überführt und für 5 Minuten bei 4°C und 150 x g die abgelösten Phoenix-Zellen durch Zentrifugation pelletiert. Je 3 ml vom Überstand wurden in ein 15-ml-Falkon überführt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Phoenix-Zellen bekamen anschließend noch einmal 7 ml Medium, in dem sich der zweite Virusüberstand anreicherte. Nach weiteren rund 18 Stunden wurde auch dieser wie der erste Überstand abgenommen, zentrifugiert und schockgefroren.

#### Infektionen von Säugerzellen mit rekombinanten Retroviren

Um Zellen mit Retroviren zu infizieren, wurden sie 24 Stunden vorher auf 10-cm-Zellkulturschalen ausplattiert. Für die Infektion wurde frisch eine Mischung aus je 2 ml Medium und 5 µl Polybrene (4 µg/µl, Hexadimethrinbromid, Sigma) angesetzt und nach Absaugen des Mediums auf die Zellen gegeben. Polybrene bindet an die Zellmembran und neutralisiert dort die Ladungen, so dass die Retroviren effizienter an ihre Rezeptoren anknüpfen können. Gleichzeitig wurden 3 ml Virusüberstand schnell aufgetaut und dann auf die Zellen getropft. Es folgte eine Inkubation von 12-16 Stunden im Inkubator bevor 5 ml Medium je 10-cm-Zellkulturschale zugegeben wurden. Die Zugabe von Antibiotikum zur Selektion erfolgreich infizierter Zellen begann 24-48 Stunden nach Infektion. Auch hier wurde der Verlauf der Selektion anhand einer Schale mit Zellen, die nicht infiziert worden waren, aber ebenfalls das Antibiotikum erhielten, verfolgt.

### **3.2.6 Differenzierung von PC12-Zellen mit NGF- $\beta$ und Entzug von NGF- $\beta$**

Dieses Experiment wurde in Anlehnung an mehrere Veröffentlichungen durchgeführt und wird hier zusammenfassend dargestellt (Biswas and Greene, 2002; Biswas et al., 2005). Für diesen Versuch wurden zur besseren Adhärenz der Zellen 6-cm-Zellkulturschalen mit Kollagen (Typ I aus der Ratte, Sigma) beschichtet. Dazu wurden 2,5 ml 50  $\mu$ g/ml Kollagen in 0,02 N Essigsäure in jede Schale gegeben und für ca. 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden die Schalen mit PBS gewaschen, getrocknet und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert. Einen Tag vor Beginn der Behandlung wurden 350.000 PC12-Zellen je 6-cm-Zellkulturschale ausplattiert. Etwa 24 Stunden später wurden die Zellen mit PBS gewaschen und dann mit Medium mit nur 1% PS versetzt. In das Medium wurde rekombinanter Nervenwachstumsfaktor- $\beta$  des Menschen (NGF- $\beta$ , nerve growth factor, Sigma) pipettiert, so dass die Endkonzentration 100 ng/ml betrug. Es folgte ein Mediumwechsel und erneute Zugabe von NGF- $\beta$  alle 2,5 Tage. Am siebenten Tag nach Beginn der Behandlung mit NGF- $\beta$  wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Dann wurde den Zellen Medium mit 1% PS gegeben und zur Neutralisierung der verbliebenen NGF- $\beta$ -Moleküle wurde anti-NGF- $\beta$  in das Medium pipettiert. Die Kontrollzellen erhielten dagegen Medium ohne Serum und erneut 100 ng/ml NGF- $\beta$ .

### **3.2.7 Färbung von seneszenten Zellen**

Zur Anfärbung von seneszenten Zellen wurden diese zunächst mit PBS pH 7,2 gewaschen. Dann wurde 0,5% Glutardialdehyd in PBS pH 7,2 zum Fixieren hinzugegeben. Es folgte eine Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Zellen mit 1 mM  $\text{MgCl}_2$  in PBS pH 7,2 gewaschen. Nun wurden 6 ml Färbelösung je 10-cm-Zellkulturschale hinzugegeben und diese mit Parafilm luftdicht abgeschlossen. Die Schalen wurden bis zur Blaufärbung der Zellen (24-48 Stunden) bei 37°C inkubiert und anschließend fotografiert.

### 3.2.8 Giemsa-Färbung von Zellen

Zunächst wurde das Medium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Nachdem die Zellkulturschalen getrocknet waren, wurde 70%iger Ethanol für 10 Minuten zur Fixierung der Zellen in die Schalen gegeben. Nach Entfernung des Ethanols wurden die Schalen dann für ca. 15 Minuten getrocknet. Je 10-cm-Zellkulturschale wurden 4 ml Giemsalösung (5% (v/v) in aqua bidest.) für 30 Minuten zugegeben. Dann wurde die Lösung abgesaugt und die Schalen mehrmals mit aqua bidest gewaschen und anschließend getrocknet.

### 3.2.9 Propidiumiodid-Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie werden Zellen, die mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert sind, entsprechend bestimmter Eigenschaften und Charakteristika separiert. Im Folgenden wird die gebräuchlichere Bezeichnung FACS (fluorescence activated cell sorting) verwendet.

Propidiumiodid ist eine DNA-interkalierende Substanz, die bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 488 nm strahlt. Da sich der DNA-Gehalt von Zellen im Zellzyklus und bei der Apoptose ändert, ist auch die Menge von eingelagertem Propidiumiodid verschieden. So können über die Stärke der Strahlung Rückschlüsse auf die Menge des eingelagerten Propidiumiodids und damit den Gehalt an DNA gezogen werden.

Sollte auch der Anteil an apoptotischen Zellen bestimmt werden, wurde das Medium der Zellen in 15-ml-Falkons überführt und nicht abgesaugt. Die Zellen wurden durch Zugabe von Trypsinlösung von den Schalen gelöst. Das Abstoppen der Trypsinreaktion erfolgte mit dem gesammelten oder neuen Medium. Nach einer Zentrifugation für 5 Minuten bei 150 x g und 4°C wurden die Pellets mit kaltem PBS resuspendiert. Erneut wurden die Proben bei denselben Bedingungen zentrifugiert. Durch Resuspendieren mit 1 ml kaltem PBS wurde eine Einzelzellsuspension hergestellt, die dann langsam unter Vortexen zu 4 ml eiskaltem Ethanol abs. getropft wurde. Dann wurden die Proben bis zur eigentlichen FACS-Messung, aber mindestens über Nacht, bei -20°C gelagert.

Am Tag der FACS-Messung wurden die Proben für 10 Minuten bei 400 x g und 4°C zentrifugiert und anschließend die Pellets in 5 ml kaltem PBS resuspendiert. Danach erfolgte eine Zentrifugation für 5 Minuten bei 400 x g und 4°C, um die Zellen erneut zu

pelletieren. Mit jeweils 500 µl Natriumzitat (38 mM) und 25 µl RNase A (10 µg/µl) wurde eine Einzelsuspension hergestellt und diese dann für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben in FACS-Röhrchen überführt und jeweils 15 µl Propidiumiodid (1 µg/µl) hinzugegeben. Bis zur Messung wurden die Proben kalt und im Dunkeln gehalten. Das Propidiumiodid-FACS wurde an einem FACS Calibur von BD Biosciences durchgeführt. Das in die DNA interkalierte Propidiumiodid wurde durch den Argon-Laser mit Licht der Wellenlänge 488 nm angeregt. Das von Propidiumiodid emittierte Licht der Wellenlänge 617 nm wurde über Spiegel zu Detektoren des Kanals 2 geleitet und dort quantifiziert. Zur Darstellung wurde die Zellzahl gegen die Fluoreszenzintensität und damit den DNA-Gehalt aufgetragen.

### **3.3 Proteinbiochemische Methoden**

#### **3.3.1 Herstellen von Proteinlysaten für den Western Blot**

Die Zellen wurden zunächst mit kaltem PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen in 1 ml kaltem PBS je 10-cm-Schale mit dem Zellschaber abgeschabt. Es folgte eine Zentrifugation für 5 Minuten bei 400 x g und 4°C. Die erhaltenen Pellets wurden in Lysepuffer resuspendiert (ca. 50 µl Lysepuffer je subkonfluente 10-cm-Schale) und anschließend auf Eis für 10 Minuten inkubiert. Durch dreimaliges Einfrieren in flüssigen Stickstoff und Auftauen im 37°C-Wasserbad wurden die Zellmembranen aufgebrochen. Nach einer Zentrifugation für 10 Minuten bei 21.000 x g und 4°C wurden die Überstände in neue Reaktionsgefäße überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

#### **3.3.2 Isolierung von Chromatin-assoziierten Proteinen**

Zunächst wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen und in 3 ml kaltem PBS je 15-cm-Schale mit einem Zellschaber abgeschabt und in ein 15-ml-Falkon überführt. Dann wurden die Zellen für 10 Minuten bei 150 x g und 4°C pelletiert und danach in ca. 1 ml Puffer A (10faches Pelletvolumen) resuspendiert. Es folgte eine Inkubation für

5 Minuten auf Eis und danach eine Zentrifugation für 4 Minuten bei 800 x g und 4°C. Das dabei erhaltene Pellet stellt die Zellkernfraktion der Zellen dar. Die Zellkerne wurden mit Puffer A nochmals gewaschen und wieder abzentrifugiert. Das Pellet wurde dann in ca. 200 µl Puffer B resuspendiert, für 20 Minuten auf Eis inkubiert und für 5 Minuten bei 800 x g und 4°C zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Es folgte die Resuspension des Pellets in 1 ml Puffer A, eine Inkubation für 3-5 Minuten auf Eis und die Zentrifugation für 5 Minuten bei 800 x g und 4°C. Auch dieser Vorgang wurde einmal so und zweimal unter Verlängerung der Inkubationszeit auf Eis auf 10 Minuten wiederholt. Dann wurde das Pellet in 300 µl 37°C-warmen Puffer A resuspendiert und 0,3 U Nuklease aus *Staphylococcus aureus* sowie 3 µl 100 mM CaCl<sub>2</sub> zugegeben. Die Reaktion wurde nach einer Inkubation für 2 Minuten bei 37°C durch Zugabe von 3 µl 100 mM EGTA gestoppt. Dann wurde die Mischung für 5 Minuten bei 800 x g und 4°C zentrifugiert und das erhaltene Pellet wurde in 1 ml Puffer B aufgenommen. Nach einer Inkubation für 30 Minuten auf Eis und nachfolgender Zentrifugation für 5 Minuten bei 800 x g und 4°C konnte der Überstand, der die Chromatin-assoziierten Proteine enthielt, gewonnen werden.

### **3.3.3 Proteinbestimmung nach Bradford**

Um die Proteinkonzentration einer Probe zu bestimmen wurde die Methode nach Bradford angewandt. Dazu wurden 100 µl 150 mM NaCl in eine Halbmikroküvette (Hirschmann® Laborgeräte) vorgelegt. Dann wurde 1 µl der Probe hinzupipettiert und durch Zugabe von 900 µl Bradford-Lösung gründlich gemischt. Die Absorption bei 595 nm wurde nach Abgleich gegen eine Probe ohne Proteinlösung bestimmt. Mit Hilfe einer mit BSA-Lösung (BSA in Lysepuffer) aufgestellten Eichkurve wurde die Proteinkonzentration berechnet.

### **3.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE war es möglich Proteine unter denaturierenden Bedingungen der Größe nach aufzutrennen (Laemmli, 1970). Dazu wurden die Proteinlysate mit der Hälfte ihres Volumens an 3x SDS-Ladepuffer versetzt und für 5 Minuten



bei 95°C aufgekocht. Dann wurden sie auf ein Gel, das aus 15%igem Trenn- und 4%-igem Sammelgel bestand, aufgetragen. Zur Bestimmung der Größe der Proteine wurden 3 µl des Molekulargewichtsmarkers SeeBlue® Plus2 (Invitrogen) in eine Geltasche gegeben und so auch aufgetrennt. Bei zunächst 80 V und später 120 V in einer Bio-Rad-Gelapparatur mit SDS-Laufpuffer erfolgte die Auftrennung der Proteine für ca. 2-3 Stunden.

### **3.3.5 Western Blot**

Nach Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE wurden sie anschließend durch einen Tank-Blot auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Membran wurde zuvor kurz in Methanol, aqua bidest. und Transferpuffer inkubiert. Das Gel wurde auf die Membran gelegt und dann zwischen Filterpapier gebracht. Diese Schichtung wurde mit Transferpuffer in eine Transblot SD Apparatur von Bio-Rad gestellt und für 1 Stunde konstant 120 V angelegt.

Nach dem Blot wurde die Membran für mindestens 3 Stunden in Blocklösung inkubiert. Dann wurde sie in Blocklösung mit primärem Antikörper über Nacht geschwenkt. Am nächsten Tag folgten drei Waschschrte für jeweils 10 Minuten in TBS-T. Dann wurde die Membran in einer Blocklösung mit sekundärem, an Meerettich-Peroxidase gekoppeltem Antikörper für eine Stunde geschwenkt. Nachdem die Membran danach dreimal für jeweils 10 Minuten mit TBS-T gewaschen worden war, erfolgte die Detektion der Banden. Dazu wurde das ECL+ Western Blot Detektionssystem (Amersham) nach Anweisung vom Hersteller genutzt.

### **3.3.6 Bestimmung der Luziferase-Aktivität (Luziferase-Assay)**

Die Zellen einer 6-cm-Schale wurden zunächst mit kaltem PBS gewaschen und dann in 500 µl kaltem PBS mit einem Zellschaber abgeschabt. Nach dem Pelletieren der Zellen für 5 Minuten bei 400 x g und 4°C wurde sie in 250 µl Kaliumphosphat-Puffer resuspendiert. Dreimal wurde diese Suspension in flüssigen Stickstoff schockgefroren und im 37°C-Wasserbad aufgetaut. Dann folgte eine Zentrifugation für 10 Minuten bei 21.000 x g und 4°C bevor der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß übertragen wurde.

Zur Bestimmung der Luziferase-Aktivität eines Lysates wurden zunächst 350 µl Luziferase-Puffer in ein 5-ml-Röhrchen vorgelegt. Dann wurden 50 µl der Probe hinzugegeben und das Röhrchen in das Luminometer gesetzt. In diesem wurden automatisch 100 µl Luciferase-Substratlösung hinzupipettiert und die Lichtemission nach erfolgter Reaktion bei 562 nm bestimmt und in relativen Lichteinheiten (RLU, Relative Light Units) angegeben. Die Lichtemission der reinen Pufferlösung als Hintergrund wurde von den anderen Werten abgezogen.

### **3.3.7 Bestimmung der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität ( $\beta$ -Gal-Assay)**

Zur Normalisierung der Luziferase-Aktivität wurde von den Lysaten auch die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität bestimmt. Dies diente dem Ausgleich unterschiedlicher Transfektionseffizienzen und verschiedener Zellzahlen, die das Ausgangsmaterial für die Lysate darstellten. Dazu wurden zuerst 750 µl  $\beta$ -Gal-Puffer in die Halbmikroküvetten pipettiert und dann 50 µl Lysat hinzugegeben. Durch Zugabe von 100 µl 6 mg/ml ONPG und Mischen wurde die Reaktion gestartet. Die Küvetten wurden luftdicht bei 37°C inkubiert, bis sich eine Gelbfärbung einstellte. Die Absorption bei 420 nm wurde nach Abgleich gegen eine Probe ohne Lysat gemessen.

## 4 ERGEBNISSE

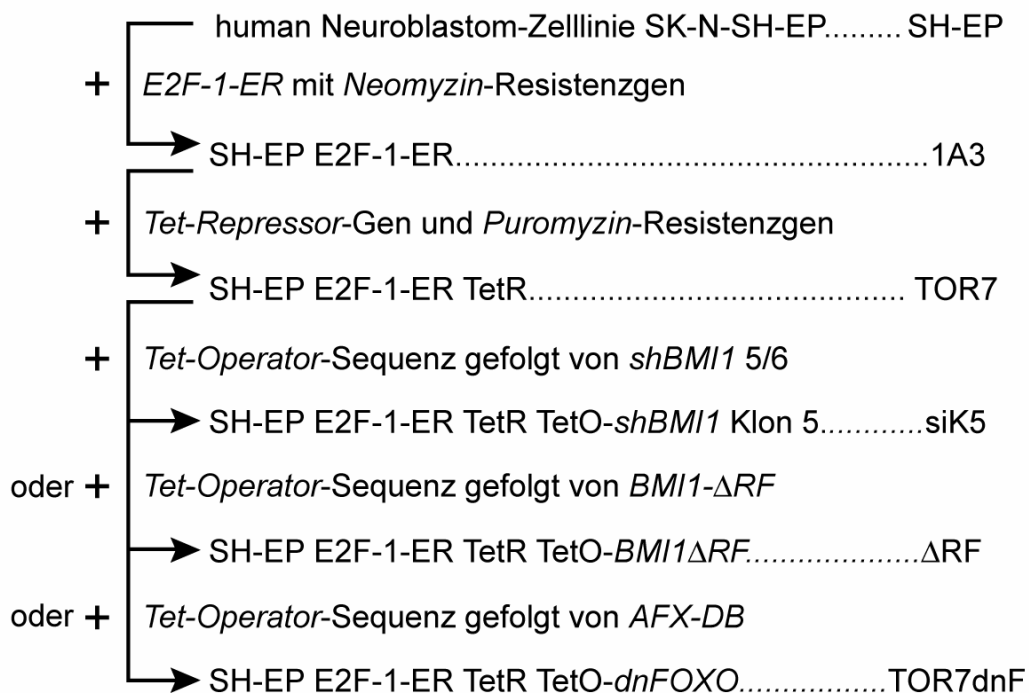
### 4.1 Die verwendeten, induzierbaren Zelllinien

Im Vorfeld meiner Doktorarbeit wurde ein cDNA-Microarray durchgeführt, um neue Zielgene von E2F-1 zu identifizieren. Dafür etablierte Verena Strieder die induzierbare Zelllinie 1A3, die von der humanen Neuroblastomzelllinie SK-N-SH-EP abstammt (Abbildung 9). Das Gen für das Fusionsprotein E2F-1-ER gekoppelt an ein *Neomycin*-Resistenzgen wurde stabil transfiziert. Der isolierte Einzelklon der Zelllinie SH-EP E2F-1-ER wurde 1A3 genannt. Dass in diesen Zellen gebildete E2F-1-ER-Protein wird vom Hitzeschockprotein 90 (Hsp90) gebunden und dadurch an der Translokation in den Zellkern gehindert. Nach Zugabe des Östrogen-Analogons 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) bindet dieses an den modifizierten Östrogenrezeptor (ER, Estrogen Rezeptor) und bewirkt eine Konformationsänderung. Dadurch erfolgt eine Ablösung des E2F-1-ER Proteins vom Hsp90 und eine Translokation in den Zellkern. Dort ist dann E2F-1 fähig, seine Zielgene zu aktivieren. Dieses induzierbare System bietet die Möglichkeit, reversibel und Dosis-abhängig die Aktivität eines Östrogenrezeptor-gekoppelten Transkriptionsfaktors zu regulieren (Eilers et al., 1989; Vigo et al., 1999). Da in einer Vielzahl von Zellkulturmedien Östrogene bzw. östrogenhaltige Substanzen enthalten sind, wurde ein modifizierter Östrogenrezeptor eingesetzt. Dieser kann nur noch von 4-OHT gebunden werden (Littlewood et al., 1995). Von diesen Zellen wurden verschiedene Derivate hergestellt, bei denen durch RNA-Interferenz oder Überexpression von dominant-negativen Allelen reversibel und induzierbar die Funktion von BMI1 oder FOXO gehemmt werden konnte (Abbildung 9). Kornelius Kerl und Katrin Killmer etablierten diese Zelllinien, denen das T-REx™ System von Invitrogen zugrunde liegt. Dieses von Invitrogen entwickelte System ermöglicht eine Tetrazyklin-abhängige Induktion von Genen. Da Tetrazyklin auf manche Zellen toxisch wirkt, wird meist das Tetrazyklin-Analogon Doxzyklin verwendet.

In 1A3-Zellen wurde zunächst der Vektor pcDNA6/TR, der das *Tet-Repressor*-Gen enthält, zusammen mit dem pBABE *PUR0* Leervektor kotransfiziert. Die Selektion mit Puromycin überlebten so nur die Zellen, die stabil das *Tet-Repressor*-Gen und das *Puromycin*-Resistenzgen integriert hatten. Der entstandene Einzelklon wurde mit dem Namen TOR7 bezeichnet. Nun wurden Plasmide mit ein oder zwei *Tet-Operator*-

Sequenzen gefolgt von verschiedenen Expressionssequenzen stabil transfiziert, die ausgehend von Vektoren pcDNA4/TO und pTER kloniert worden waren. Das Plasmid pTER *shBMI1* 5/6 enthält die Sequenz für die Bildung einer *short hairpin RNA* (*shRNA*, kurze Haarnadel-RNA) gegen *BMI1* und das Zeozin-Resistenzgen. *Short hairpin RNAs* bestehen aus einer RNA-Sequenz, die teilweise intermolekular hybridisieren kann und dabei eine Haarnadel-Struktur bildet. Durch Abbau der Schleife in der Zelle werden die *shRNAs* in sogenannte *small interfering RNAs* (*siRNAs*) umgewandelt. Durch RNA-Interferenz erfolgt dann der Abbau der mRNA-Sequenzen, die eine hohe Sequenzhomologie zu der *siRNA* aufweisen. Eine genauere Beschreibung der RNA-Interferenz geben verschiedene Übersichtsartikel (Mello and Conte, Jr., 2004; Hannon, 2002). Dieser Vektor wurde stabil in TOR7-Zellen transfiziert und mit Zeozin selektioniert. Der isolierte Einzelklon #5 erhielt die Abkürzung siK5.

#### Kurzbezeichnung



**Abbildung 9: Übersicht über die verwendeten, induzierbaren Zelllinien.** Diese Zelllinien wurden von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe etabliert und im Rahmen dieser Doktorarbeit verwendet. Ausgehend von der humanen Neuroblastomzelllinie SK-N-SH-EP wurden verschiedene Konstrukte stabil transfiziert und Einzelklone isoliert. Durch Nutzung des T-REx™ Systems von Invitrogen können in diesen Zelllinien verschiedene Sequenzen reversibel induziert werden.

Auch die Sequenz von *BMII*, welches die Deletion der Ringfingerdomäne aufwies, zusammen mit dem *Zeozin*-Resistenzgen wurde durch Transfektion des Vektors pcDNA4/TO *BMII-ΔRF* stabil in die TOR7-Zellen integriert. Die Ringfingerdomäne ist essentiell für Protein-Protein-Interaktionen und die Deletion dieser Domäne resultiert in der Bildung eines verkürzten BMI1-Proteins (Abbildung 17). Dieses kann mit dem Wildtyp-BMI1 dimerisieren und seine Funktion inhibieren, weshalb das verkürzte BMI1-Protein auch als dominant-negativer Mutant bezeichnet wurde (Itahana et al., 2003). Die durch Isolierung eines Einzelklons entstandene Zelllinie wurde mit  $\Delta RF$  abgekürzt. Dann wurde das Plasmid pcDNA4/TO *AFX-DB*, das die Sequenz der DNA-Bindedomäne von FOXO4. und der Leervektor pBABE *HYGRO*, kotransfiziert. Die DNA-Binde- oder Forkhead-Domäne ist in den humanen FOXOs konserviert und kann auf die Wildtyp-FOXOs als dominant-negatives Protein (dnFOXO) wirken (Medema et al., 2000; van den Heuvel et al., 2005). Nach der Selektion mit Hygromyzin B wurde ein Einzelklon separiert, der die Abkürzung TOR7dnF erhielt.

In einem cDNA-Microarray wurde von Christoph Kramps (persönliche Mitteilung) die Genexpression von 1A3-Zellen, behandelt mit 200 nM 4-OHT bzw. mit dem Lösungsmittel Ethanol, miteinander verglichen. Unter anderen wurde *BMII* als potenzielles E2F-1-Zielgen ermittelt. Trotz der geringen Qualität dieses Pilotexperimentes konnte *BMII* in weiteren Versuchen als direktes Zielgen von E2F-1 bestätigt werden (persönliche Mitteilung von Christoph Kramps). Diese Zelllinien und Daten, die aus Vorarbeiten von verschiedenen Mitgliedern der Arbeitsgruppe (Christoph Kramps, Verena Strieder, Daniel Fehr, Kornelius Kerl und Katrin Killmer) stammen, stellten den Ausgangspunkt für die Experimente meiner Doktorarbeit dar.

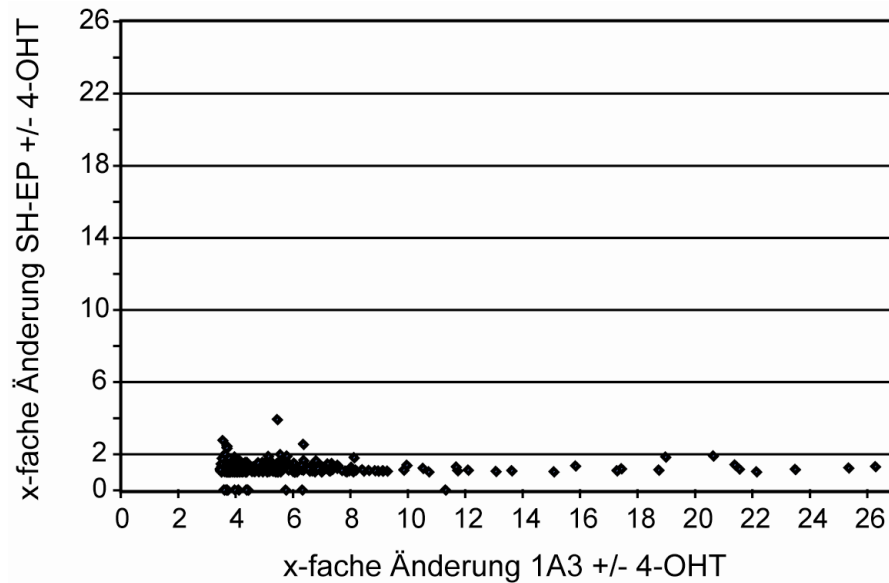
## 4.2 Die Regulation von *BMII* durch E2F-1 und die Rolle von BMI1 für die E2F-1-Funktion

Nachdem *BMII* als direktes E2F-1-Zielgen bestätigt werden konnte, sollten nun die biochemischen Konsequenzen dieser Interaktion als auch die Rolle von BMI1 für die E2F-1-Funktion geklärt werden. Außerdem war von Interesse, ob die Regulation von BMI1 durch E2F-1 ein generelles Phänomen ist und ob dies Auswirkungen auf BMI1-Zielgene hat.

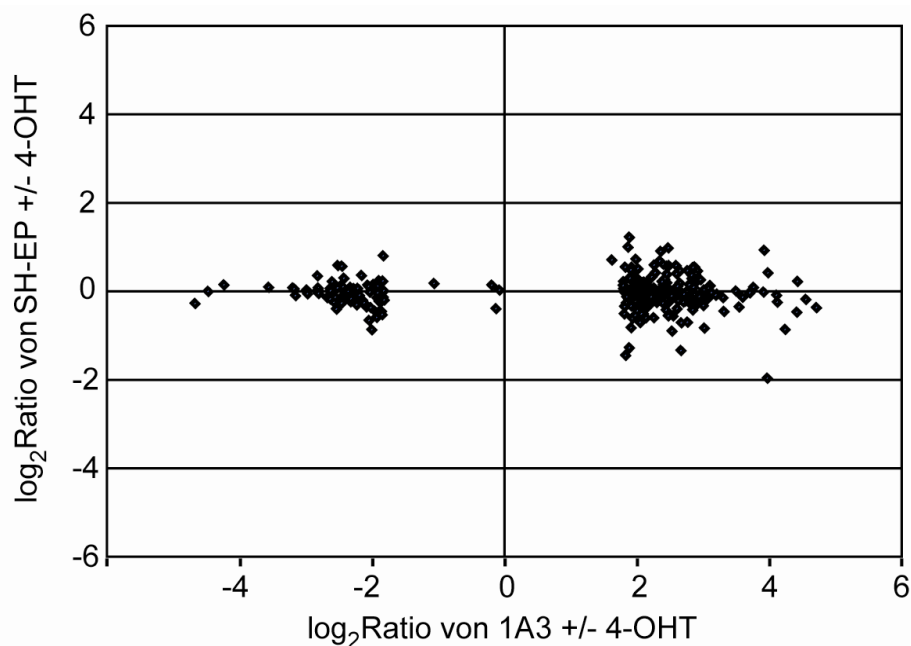
#### 4.2.1 Die Induktion der *BMI1*-mRNA und die Erhöhung der BMI1-Proteinmenge in verschiedenen Zelllinien

Für den cDNA-Microarray zur Ermittlung von neuen E2F-1-Zielgenen war die Zelllinie 1A3 verwendet worden, in der das E2F-1-ER-Fusionsprotein durch Zugabe von 4-OHT aktiviert werden kann (persönliche Mitteilung von Christoph Kramps). Zur Bestätigung der Daten des ersten cDNA-Microarrays, wurde der Versuch wiederholt. Die RNA von 1A3-Zellen, die für 12 Stunden mit 200 nM 4-OHT oder Ethanol behandelt worden waren, wurde isoliert und cDNA synthetisiert. Um den Einfluss von 4-OHT auf die Zellen von der Induktion durch E2F-1 zu trennen, wurde der cDNA-Microarray parallel mit den parental SK-N-SH-EP durchgeführt. Dazu wurden auch die parental SK-N-SH-EP-Zellen für 12 Stunden mit 200 nM 4-OHT bzw. Ethanol behandelt, anschließend RNA isoliert und in cDNA revers transkribiert.

Der Vergleich der Genexpression von 1A3-Zellen mit bzw. ohne aktiviertem E2F-1-ER ergab nach statistischer Auswertung 236 induzierte und 75 reprimierte Gene (Tabelle 8, Anhang). Von diesen 311 Genen, die mindestens 3,5-fach reguliert waren, zeigten weniger als 2% nach Behandlung von parental SK-N-SH-EP-Zellen mit 4-OHT eine Änderung ihrer Expression. Die Scatter-Blots in Abbildung 10 und Abbildung 11 vergleichen die x-fachen Expressionsänderungen der 311 Gene in 1A3- und SH-EP-Zellen sowie deren  $\log_2$ Ratio. Es ist klar ersichtlich, dass die Gene, die in 1A3-Zellen nach 4-OHT-Behandlung eine mehr als zweifache Modifikation ihrer Genexpression erfuhren, in SH-EP-Zellen selten mehr als zweifach reguliert waren (Abbildung 10). Bei Betrachtung der  $\log_2$ Ratio ist erkennbar, dass die Werte der meisten Gene in 1A3-Zellen zwischen -4 und -2 bzw. 2 und 4 lagen (Abbildung 11). In SH-EP-Zellen waren dagegen die Expressionsverhältnisse dieser Gene mit bzw. ohne 4-OHT zwischen 2 und -2. Damit wurde deutlich, dass der Großteil der Genexpressionsänderungen auf die Anwesenheit vom durch 4-OHT-aktivierbaren E2F-1-ER-Fusionsprotein zurückzuführen ist. Die 4-OHT-Behandlung für sich genommen, ändert die Expression dieser Gene nur unwesentlich.



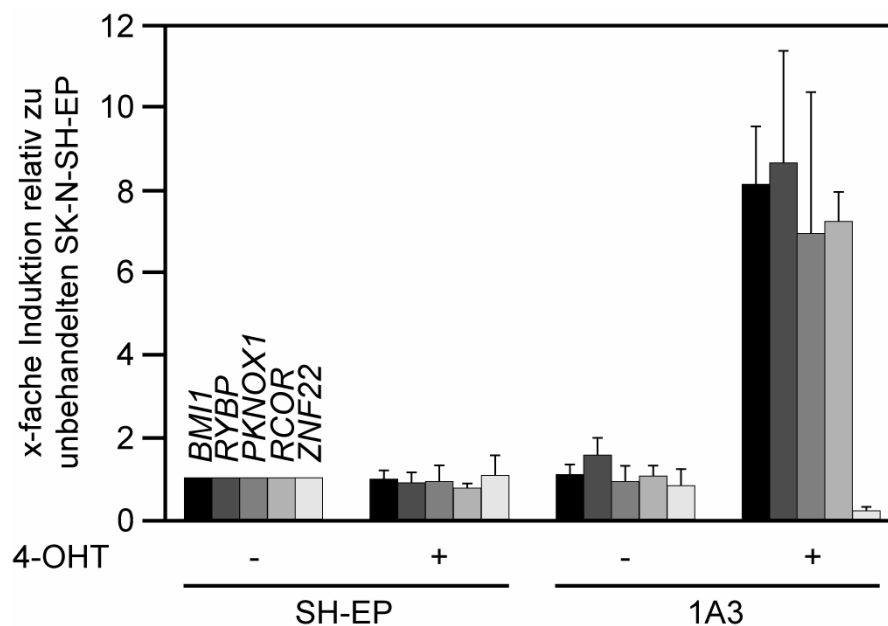
**Abbildung 10: Vergleich der x-fachen Änderung der Genexpression von SH-EP- und 1A3-Zellen bei Behandlung mit 4-OHT.** In diesem Scatter-Blot sind die absoluten Werte der beiden Zelllinien gegeneinander aufgetragen. Dargestellt sind nur die Expressionsänderungen der Gene, die in 1A3-Zellen nach 4-OHT-Behandlung eine mindestens 3,5-fache Regulation ihrer Genexpression erfuhren.



**Abbildung 11: Vergleich der  $\log_2$ Ratios der Genexpressionsänderungen von SH-EP- und 1A3-Zellen bei Behandlung mit 4-OHT.** In diesem Scatter-Blot sind die  $\log_2$ Ratios gegeneinander aufgetragen. Die  $\log_2$ Ratios sind ein weiteres Bewertungskriterium für Genexpressionsänderungen. Ein  $\log_2$ Ratio von 0 bedeutet, dass keine Änderung der Genexpression nach 4-OHT-Behandlung stattgefunden hat. Es sind nur die  $\log_2$ Ratio der Gene dargestellt, deren Expression sich in 1A3-Zellen nach 4-OHT-Behandlung mindestens 3,5-fach geändert hatte.

Um die Funktionstüchtigkeit des cDNA-Microarrays zu bestätigen, wurde die Expressionsänderung von 4 frei gewählten Genen und *BMII* mittels qRT-PCRs

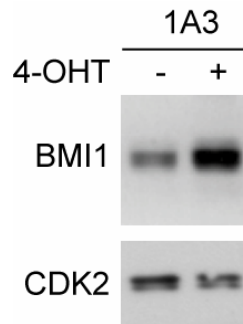
untersucht. Dazu wurden die cDNAs von 1A3- und SH-EP-Zellen nach 4-OHT- bzw. Ethanol-Behandlung genutzt. Während in den parentalen SH-EP keine Änderung der Genexpression gesehen war, zeigte sich in 1A3-Zellen eine Aktivierung bzw. Repression von den potenziellen E2F-1-Zielgenen (Abbildung 12). Die quantitativen PCR-Ergebnisse bestätigten die durch den cDNA-Microarray gefundenen Zielgene von E2F-1. Dabei wirkt E2F-1 auf *BMII*, *RYBP*, *PKNOX1* und *RCOR* aktivierend, während *ZNF22* ein reprimiertes Zielgen darstellt (Abbildung 12).



**Abbildung 12: Änderung der Expression ausgesuchter Gene in SH-EP- und 1A3-Zellen nach Behandlung mit 4-OHT.** Die Zellen wurden für 12 Stunden mit 200 nM 4-OHT oder Ethanol behandelt. Dann wurde die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels qRT-PCRs die relativen mRNA-Mengen der verschiedenen Gene bestimmt. Normalisiert wurde dabei auf *RPS14*, das für ein humanes, ribosomales Protein kodiert.

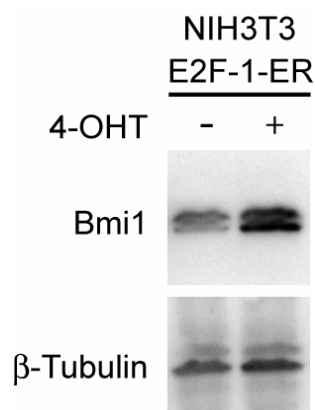
Nachdem in früheren Arbeiten die aktivierende Wirkung von E2F-1 auf die *BMII*-mRNA gezeigt werden konnte, sollte nun ein möglicher Effekt auf die *BMII*-Proteinmengen ermittelt werden. 1A3-Zellen wurden für 14 Stunden mit 200 nM 4-OHT behandelt und anschließend Proteinlysate hergestellt. Der Western Blot zeigte die Erhöhung der *BMII*-Proteinmengen nach Induktion von E2F-1 (Abbildung 13).





**Abbildung 13: Erhöhung der BMI1-Proteinmengen nach Behandlung von 1A3-Zellen mit 4-OHT.** 1A3-Zellen wurden für 14 Stunden mit 200 nM 4-OHT behandelt und anschließend Proteinlysate hergestellt. Die Proteine wurden entsprechend ihres Molekulargewichtes in der SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend durch Western Blot auf eine PVDF-Membran übertragen. Für die Detektion wurden anti-BMI1-Antikörper und für die Ladungskontrolle anti-CDK2-Antikörper genutzt.

Bisher wurde die Aktivierung von BMI1 durch E2F-1 in humanen Neuroblastomzellen untersucht. Um Zelllinien- und Organismen-spezifische Effekte auszuschließen, sollte die Wirkung von E2F-1 auf BMI1 in einer anderen nicht-humanen Zelllinie ermittelt werden. Dazu wurden die immortalisierten Mausfibroblasten NIH3T3 mit Retroviren, die die DNA von *E2F-1-ER* und das *Neomycin*-Resistenzgen enthielten, infiziert. Aufgrund der Neomycin-Resistenz konnte eine Selektion mit G418 (einem Neomycin-Analogon) durchgeführt werden. Die überlebenden Zellen wurden für 15 Stunden mit 200 nM 4-OHT behandelt, lysiert und dann zu Proteinlysate verarbeitet.

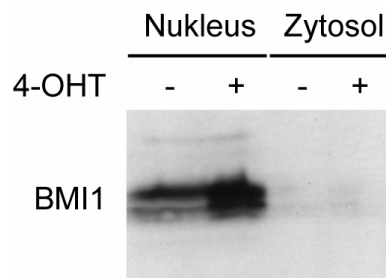


**Abbildung 14: In NIH3T3-Zellen mit E2F-1-ER-Fusionsprotein ist eine Steigerung der Bmi1-Menge nach Behandlung mit 4-OHT zu erkennen.** NIH3T3-Zellen wurden mit Retroviren, die das Konstrukt pWZL *NEO HA-ER-E2F-1* enthielten, infiziert und mit G418 selektioniert. Die Zellen wurden dann für 15 Stunden mit 200 nM 4-OHT behandelt. Anschließend wurden Proteinlysate hergestellt, eine SDS-PAGE und ein Western Blot durchgeführt und Bmi1 mittels anti-BMI1-Antikörper detektiert. Als Ladungskontrolle diente  $\beta$ -Tubulin, das mit anti- $\beta$ -Tubulinantikörpern nachgewiesen wurde.

Im Western Blot ist eine deutliche Erhöhung der Bmi1-Proteinmengen bei Zugabe von 4-OHT zu sehen (Abbildung 14). Mitarbeiter der Arbeitsgruppe konnten gleiche Ergebnisse in Rat1 Rattenfibroblasten beobachten. Damit kann geschlussfolgert werden, dass die Aktivierung von BMI1 durch E2F-1 in verschiedenen Organismen und Zelltypen stattfindet.

#### 4.2.2 E2F-1-induziertes BMI1 ist im Zellkern lokalisiert

Damit Transkriptionsfaktoren, wie BMI1, auf die Promotoren ihrer Zielgene wirken können, ist ihre Lokalisation im Zellkern essentiell. Mittels Immunfluoreszenz war u. a. gezeigt worden, dass BMI1 in HeLa-Zellen im Zellkern lokalisiert ist (Voncken et al., 1999). Das sollte für SH-EP-Zellen durch Fraktionierung der zellulären Proteine untersucht werden. Zusätzlich war von Interesse, ob die durch E2F-1 induzierte Menge an BMI1 im Zellkern oder Zytoplasma zu finden ist. Dazu wurden 1A3-Zellen für 12 Stunden mit 200 nM 4-OHT oder Ethanol behandelt. Anschließend wurden die zytosolische und die Zellkernfraktion der Proteine isoliert. Diese Lysate wurden mir für einen Western Blot von Christine Gessner zur Verfügung gestellt.

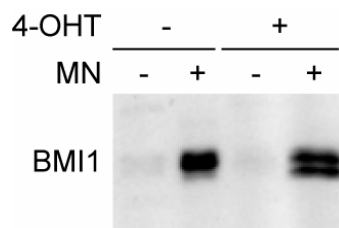


**Abbildung 15: Endogenes als auch durch E2F-1-induziertes BMI1 ist im Nukleus lokalisiert.** 1A3-Zellen wurden für 12 Stunden mit 200 nM 4-OHT oder Ethanol behandelt. Dann wurde die zytosolische und Zellkernfraktion der Proteine isoliert. Durch SDS-PAGE und Western Blot erfolgte die Auftrennung und Übertragung der Proteine auf eine Membran. BMI1 wurde mittels anti-BMI1-Antikörper detektiert.

Im nicht-induzierten Zustand ist BMI1 hauptsächlich im Zellkern lokalisiert (Abbildung 15). Die Aktivierung von *BMI1* durch E2F-1-ER bewirkt eine Erhöhung der BMI1-Proteinmenge im Zellkern. Auch hier ist der Hauptanteil von BMI1 im Zellkern und somit an seinem Wirkungsort.

### 4.2.3 Die Chromatinassoziation von E2F-1-induziertem BMI1

Es war bekannt, dass BMI1 an Chromatin gebunden ist (Voncken et al., 1999). Nun sollte untersucht werden, ob das E2F-1-induzierte BMI1 ebenfalls eine Chromatinassoziation aufweist. Dazu wurden 1A3-Zellen für 12 Stunden mit 200 nM 4-OHT behandelt und anschließend zwei Kernproteinfraktionen hergestellt. Neben der Extraktion der löslichen Kernproteinfraktion wurden mit einer Nuklease, isoliert aus *Staphylococcus aureus*, die Chromatin-gebundenen Proteine freigesetzt. Die Fraktionen wurden im Western Blot auf ihre Menge an BMI1 analysiert (Abbildung 16). In der löslichen Kernproteinfraktion befand sich nur eine sehr geringe BMI1-Menge. Sowohl in unbehandelten als auch in mit 4-OHT-behandelten 1A3-Zellen war dagegen der Hauptanteil von BMI1 an Chromatin gebunden.

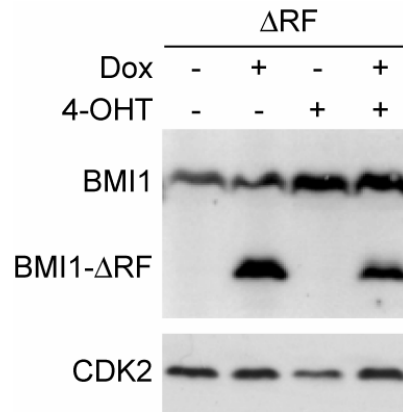


**Abbildung 16: E2F-1-induziertes BMI1 ist Chromatin-assoziiert.** 1A3-Zellen wurden für 12 Stunden mit 200 nM 4-OHT oder Ethanol behandelt. Dann wurden die löslichen Proteine des Nukleus und durch Nutzung einer Nuklease die Chromatin-assoziierten Proteine isoliert. Nach SDS-PAGE und Western Blot wurde BMI1 mittels anti-BMI1-Antikörper nachgewiesen.

Wie auch schon in Abbildung 15 ersichtlich, zeigt BMI1 im Western Blot manchmal zwei Banden. Dies kann durch einen unterschiedlichen Phosphorylierungsgrad von BMI1 erklärt werden. In Abbildung 16 scheint die zweite Bande von BMI1 geringeren Molekulargewichtes erst nach Induktion mit 4-OHT aufzutauchen. Jedoch wird durch eine stärkere Belichtung deutlich, dass auch bei Behandlung mit Ethanol zwei Banden zu sehen sind (Daten nicht gezeigt). Diese erscheinen aufgrund der Stärke der Banden durch die Stauchung der Laufbahn und der begrenzten Auflösung der Abbildung als eine Bande.

#### 4.2.4 „Loss-of-Function“-Systeme von BMI1 und ihre Auswirkungen

Da die Induktion von E2F-1 die BMI1-Mengen erhöht, sollten durch die Aktivierung von E2F-1 auch Zielgene von BMI1 beeinflusst werden können. Um entsprechende Gene zu ermitteln, sollte ein cDNA-Microarray mit  $\Delta$ RF-Zellen durchgeführt werden. In diesen Zellen kann neben der E2F-1-ER-Aktivierung durch Zugabe von Doxyzyklin ein verkürztes, exogenes BMI1-Protein gebildet werden (siehe 4.1 und Abbildung 9). Diesem Protein fehlt die Ringfingerdomäne (Deletion der Ringfinger-D,  $\Delta$ RF), die für die Protein-Protein-Interaktionen notwendig ist. Es war beschrieben, dass BMI1- $\Delta$ RF als dominant-negatives Protein wirkt und deshalb mit dem endogenen BMI1 kompetitiert (Itahana et al., 2003). Im cDNA-Microarray sollten  $\Delta$ RF-Zellen mit und ohne Doxyzyklin-Behandlung bei aktiviertem E2F-1-ER miteinander verglichen werden. So sollten Gene ermittelt werden, die bei Anwesenheit von dominant-negativem BMI1 durch E2F-1-ER-Aktivierung nicht mehr reguliert werden. Die  $\Delta$ RF-Zellen wurden für 14 Stunden mit Doxyzyklin behandelt, gefolgt von 4 Stunden mit Doxyzyklin und 200 nM 4-OHT. Die Behandlung mit Doxyzyklin allein dauerte 18 Stunden. Anschließend wurden RNA für einen cDNA-Microarray und Proteine für einen Western Blot aus diesen Zellen isoliert. Im Western Blot sollte die Induktion von BMI1- $\Delta$ RF überprüft und Verunreinigungen zwischen den Proben ausgeschlossen werden. Während die Induktion von BMI1- $\Delta$ RF nach Gabe von Doxyzyklin erkennbar ist, war in den jeweils nicht mit Doxyzyklin-behandelten Zellen kein BMI1- $\Delta$ RF nachweisbar (Abbildung 17). Die Inkubationszeit mit 4-OHT wurde für den cDNA-Microarray möglichst gering gehalten, da nur die mRNA-Mengen von direkten Zielgenen verändert werden sollten. Da auch die Translation der *BMI1*-mRNA mehr Zeit benötigt, waren die Proteinmengen vom direkten Zielgen *BMI1* nur geringfügig erhöht.



**Abbildung 17: Induktion von BMI1- $\Delta$ RF nach Behandlung von  $\Delta$ RF-Zellen mit Doxyzyklin.**  $\Delta$ RF-Zellen wurden für 14 Stunden mit 1  $\mu$ g/ml Doxyzyklin oder Ethanol behandelt. Dann wurden die Zellen 4 Stunden mit Doxyzyklin und/oder 200 nM 4-OHT inkubiert. Anschließend wurden die Proteine isoliert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot auf eine Membran transferiert. BMI1 und BMI1- $\Delta$ RF konnten mittels anti-BMI1-Antikörper und die Ladekontrolle CDK2 mittels anti-CDK2-Antikörper detektiert werden.

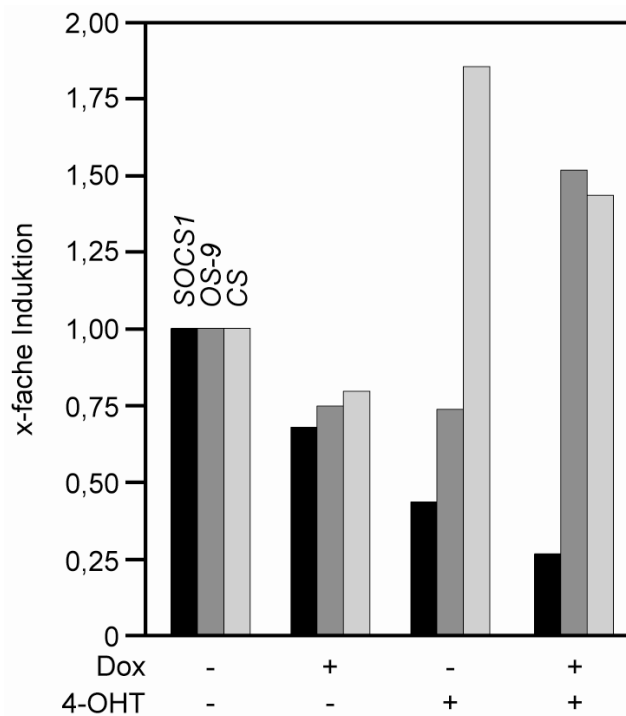
Im cDNA-Microarray wurde die Genexpression von  $\Delta$ RF-Zellen verglichen, die bei jeweils aktiviertem E2F-1-ER mit bzw. ohne Doxyzyklin behandelt wurden. Alle Gene, die eine Änderung der Genexpression  $> 3,0$  zeigten, sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Da BMI1 ein Repressor ist, sollten bei Anwesenheit vom dominant-negativem Protein BMI1-Zielgene induziert werden. Dies konnte durch den cDNA-Microarray bestätigt werden, da bis auf eine Ausnahme alle gefundenen Gene eine Aktivierung zeigten. Die drei im cDNA-Microarray am stärksten differentiell exprimierten Gene repräsentierten *BMI1* selbst. Dies bestätigt die effiziente Induktion von BMI1- $\Delta$ RF in den verwendeten Zellen nach Zugabe von Doxyzyklin und beweist die Funktionstüchtigkeit des cDNA-Microarrays. Insgesamt wurde die Expression von 61 Genen mehr als zweifach reguliert.

Um die Ergebnisse des cDNA-Microarrays zu bestätigen, wurden aus dieser Liste drei Gene ausgewählt und die Änderungen der mRNA-Mengen mittels qRT-PCRs näher untersucht. Dazu wurden  $\Delta$ RF-Zellen für 24 Stunden mit Doxyzyklin gefolgt von weiteren 16 Stunden mit zusätzlich 200 nM 4-OHT behandelt, anschließend RNA isoliert und cDNA synthetisiert.

**Tabelle 4: Gene, deren Expression sich bei Induktion von BMI1-ΔRF in ΔRF-Zellen in Anwesenheit von aktiviertem E2F-1-ER mehr als dreifach änderte.** ΔRF-Zellen wurden für 14 Stunden mit 1μg/ml Doxyzyklin oder Ethanol inkubiert, gefolgt von einer 4-stündigen Behandlung mit Doxyzyklin und 200 nM 4-OHT. Dann wurde die RNA isoliert und für einen cDNA-Microarray genutzt. Dabei diente die Probe ohne Doxyzyklin-Behandlung als Referenz. Die Daten wurden von Birgit Samans ausgewertet. x-fach...x-fache Änderung der Genexpression. Richtung...Genexpression ist bei induziertem BMI1-ΔRF erhöht (hoch) oder erniedrigt (runter) im Vergleich zu ΔRF-Zellen, in denen BMI1-ΔRF nicht aktiviert wurde.

x-fach	Richtung	Symbol	Bezeichnung des Gens
14,45	hoch	BMI1	polycomb protein
8,39	hoch	BMI1	polycomb protein
6,63	hoch	BMI1	polycomb protein
6,23	hoch	SOCS1	suppressor of cytokine signaling 1
6,02	hoch	ARF1	ADP-ribosylation factor 1
5,86	hoch	OK/SW-cl.56	beta 5-tubulin
5,47	hoch	MTHFD1	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase
4,96	hoch	SHC1	SHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein 1
4,79	hoch	DHX9	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 9
4,62	hoch	CS	citrate synthase
4,51	hoch	SLC20A1	solute carrier family 20 (phosphate transporter), member 1
4,07	hoch	ACTG2	actin, gamma 2, smooth muscle, enteric
4,05	hoch	OS-9	amplified in osteosarcoma
3,75	hoch	TAGLN2	transgelin 2
3,66	hoch	KRT8	keratin 8
3,62	hoch	PES1	pescadillo homolog 1, containing BRCT domain (zebrafish)
3,40	hoch	APP	amyloid beta (A4) precursor protein
3,35	hoch	PSAP	prosaposin (variant Gaucher disease and variant meta-chromatic leukodystrophy)
3,30	hoch	ZSIG11	putative secreted protein ZSIG11
3,24	runter	RIOK3	RIO kinase 3 (yeast)
3,11	hoch	TRIM25	tripartite motif-containing 25
3,10	hoch	BAZ1B	bromodomain adjacent to zinc finger domain, 1B
3,09	hoch	KATNA1	katanin p60 (ATPase-containing) subunit A 1
3,06	hoch	ELAVL1	ELAV (embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila)-like 1 (Hu antigen R)
3,04	hoch	HRMT1L2	HMT1 hnRNP methyltransferase-like 2 (S. cerevisiae)
3,01	hoch	NCL	nucleolin

Nach *BMI1* selbst war *SOCS1* (suppressor of cytokine signaling 1), mit einer mehr als sechsfachen Aktivierung, das am stärksten differentiell exprimierte Gen. *SOCS1* ist ein kritischer Regulator des Zytokin-Signalweges und der Immunantworten, da es u.a. in der Lage ist den Typ I Interferon-Signalweg zu hemmen. *SOCS1*-defiziente Mäuse sterben während der neonatalen Entwicklung aufgrund von Entzündungen multipler Organe und anormaler Hämatopoese.



**Abbildung 18:** Veränderung der relativen mRNA-Mengen von *SOCS1*, *OS-9* und *CS* nach Behandlung von  $\Delta$ RF-Zellen mit Doxyzyklin und/oder 4-OHT.  $\Delta$ RF-Zellen wurden für 24 Stunden mit 1  $\mu$ g/ml Doxyzyklin oder Ethanol gefolgt von weiteren 16 Stunden mit 200 nM 4-OHT oder Ethanol behandelt. Dann wurde die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels qRT-PCRs die mRNA-Mengen der Gene ermittelt. Die mRNA-Mengen von *RPS14* dienten wieder zur Normalisierung.

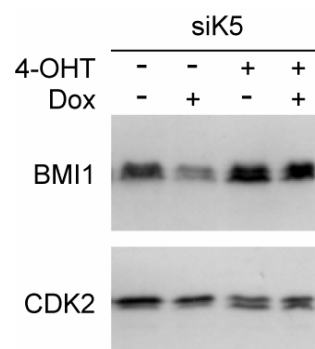
Die mRNA-Mengen von *SOCS1* bei Induktion von BMI1- $\Delta$ RF mit Doxyzyklin sind in der qRT-PCR auf rund 0,7 leicht verringert (Abbildung 18). Die 4-OHT-Behandlung allein bewirkt eine Repression des *SOCS1*-Gens auf unter 0,5. Die Gabe von Doxyzyklin und 4-OHT resultiert in einer Hemmung der mRNA-Bildung auf ca. 0,25.

*OS-9* (amplified in osteosarcoma), dessen Expression im cDNA-Microarray eine ca. vierfache Induktion zeigte, wurde aufgrund seiner Rolle in Tumoren ausgewählt. Es wird häufig ko-amplifiziert mit *CDK4* in menschlichen Sarkomen gefunden. Besonders stark exprimiert kommt es in Osteosarkomen vor. Sowohl mit Doxyzyklin als auch mit 4-OHT allein erfolgte eine geringfügige Verringerung der mRNA-Mengen von *OS-9* auf ca. 0,75 (Abbildung 18). Die Behandlung der Zellen mit Doxyzyklin und 4-OHT führte zu einer 1,5-fachen Aktivierung von *OS-9*.

Die Genexpression der *CS* (citrate synthase, Zitratsynthase) wurde im cDNA-Microarray 4,62-fach aktiviert. Das Gen kodiert für ein essentielles Enzym des Zitronensäurezykluses, der in der mitochondrialen Matrix stattfindet und Vorstufen zur ATP-Bildung bereitstellt. Erhöhte Aktivität der Zitratsynthase konnte in manchen

Tumoren nachgewiesen werden, so zum Beispiel in Tumoren der Bauchspeicheldrüse. Die Gabe von Doxyzyklin und damit Induktion von BMI1- $\Delta$ RF verringerte die mRNA-Mengen der CS nur minimal auf 0,8 (Abbildung 18). Die Behandlung mit 4-OHT resultierte in einer 1,85-fachen Erhöhung der mRNA-Mengen. Bei Gabe von Doxyzyklin und 4-OHT war ebenfalls Induktion der CS-mRNA auf ca. 1,4 erkennbar. Für keines der drei untersuchten Gene stimmten die Ergebnisse der qRT-PCRs mit denen des cDNA-Microarrays überein. Da die eventuellen Ursachen für diese Probleme nicht ohne weiteres zu bewältigen waren, wurde mit diesem Zellsystem nicht weiter gearbeitet (siehe 5.1.4). Die Ergebnisse deuteten ferner darauf hin, dass *SOCS1* unter Umständen durch E2F-1 reprimiert wird, während CS möglicherweise ein aktiviertes E2F-1-Zielgen darstellt. Diese Ergebnisse wurden jedoch nicht weiter verfolgt.

Parallel zu dem Zellklon, in dem die Induktion von dominant-negativem BMI1 möglich ist, wurde von Kornelius Kerl die stabile Zelllinie siK5 etabliert (siehe 4.1 und Abbildung 9), in der durch Zugabe von Doxyzyklin die Bildung einer *shRNA* gegen *BMI1* induziert werden kann. Zunächst wurde die Effektivität der RNA-Interferenz in siK5-Zellen überprüft. Dazu wurden siK5-Zellen für 22 Stunden mit Doxyzyklin und für weitere 14 Stunden mit Doxyzyklin und 200 nM 4-OHT behandelt und mittels Western Blots die Proteinmengen von BMI1 bestimmt (Abbildung 19).



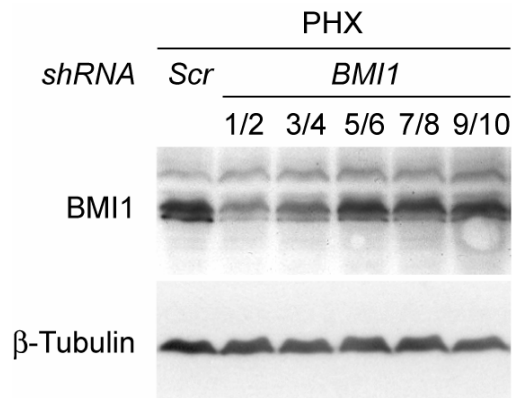
**Abbildung 19: Reduktion der BMI1-Mengen bei Induktion von *shRNA* gegen *BMI1* durch Behandlung von siK5-Zellen mit Doxyzyklin.** siK5-Zellen wurden für 22 Stunden mit 1  $\mu$ g/ml Doxyzyklin oder Ethanol behandelt. Dann erfolgte die Inkubation der Zellen für weitere 14 Stunden mit Doxyzyklin und/oder 200 nM 4-OHT. Anschließend wurden die Proteine isoliert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und beim Western Blot auf eine Membran übertragen. Die Detektion von BMI1 und der Ladekontrolle CDK2 erfolgte durch Nutzung von anti-BMI1- bzw. anti-CDK2-Antikörpern.

Nach Induktion der *shRNA* gegen *BMI1* erfolgte eine Reduktion der Proteinmenge. Leider war dieser Effekt für weiterführende Experimente zu schwach und in



Wiederholungsexperimenten nicht reproduzierbar (Daten nicht gezeigt). Die Erhöhung der BMI1-Proteinmenge nach Induktion mit 4-OHT ist erkennbar. Die gleichzeitige Gabe von Doxyzyklin änderte die Menge an BMI1 nicht.

Da das induzierbare System keine deutliche, reproduzierbare Reduktion von BMI1 auf Proteinebene zeigte, sollten *shBMI1*-Klone hergestellt werden, die die *shRNA* gerichtet gegen *BMI1* konstitutiv exprimierten. Zunächst wurden eine Reihe verschiedener *shRNAs* auf ihre Effizienz getestet. Die Plasmide pSUPER *shBMI1* 1/2, 3/4 und 5/6 wurden von Kornelius Kerl (persönliche Kommunikation), pTER *shBMI1* 7/8 von mir und pTER *shBMI1* 9/10 von Christine Gessner kloniert. Der pTER-Vektor besitzt hohe Sequenzhomologie zum pSUPER-Vektor und kann ebenfalls zur Expression von *shRNAs* genutzt werden. Zum Testen wurden Phoenix-Zellen (PHX) mit den *shBMI1*-Konstrukten sowie pSUPER *shScrambled* (*shRNA* mit beliebiger Sequenz, die weder gegen ein Gen der Maus noch des Menschen gerichtet ist) als Negativkontrolle transfiziert. Dabei erfolgte eine Kotransfektion mit pBABE *PUR0*-Leervektor, um eine positive Selektion der transfizierten Zellen zu ermöglichen. Die Zellen wurden ca. 3,5 Tage nach Beginn der Transfektion lysiert und die Proteinmenge von BMI1 mittels Western Blots analysiert (Abbildung 20).

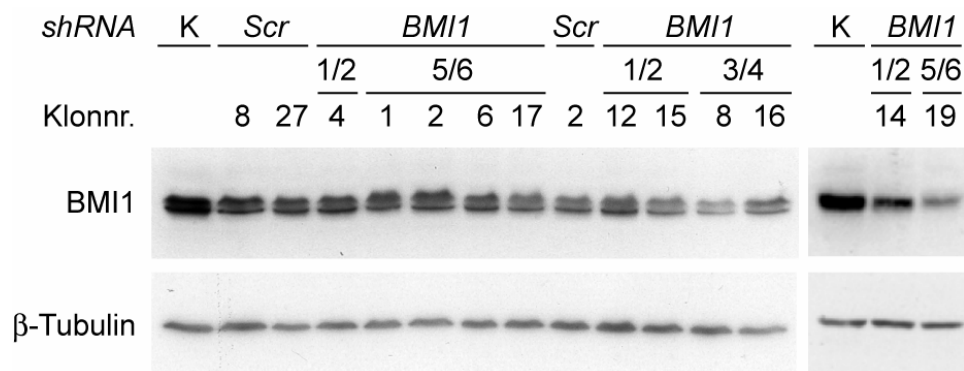


**Abbildung 20: Verschieden starke Reduktion der BMI1-Proteinmengen nach Transfektion von Vektoren mit *shRNAs* gegen *BMI1* in PHX-Zellen.** PHX-Zellen wurden mit pSUPER- oder pTER-Konstrukten und pBABE *PUR0*-Leervektor transfiziert. Nach erfolgter Selektion mit Puromycin wurden die Proteine isoliert, mittels SDS-PAGE und Western Blot aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und dort detektiert. Dazu wurden anti-BMI1-Antikörper und für die Ladekontrolle anti-β-Tubulin-Antikörper verwendet.

Die Konstrukte pSUPER *shBMI1* 1/2 und 3/4 zeigten die effizienteste Reduktion der BMI1-Menge in diesen Zellen. Deshalb wurden diese beiden Plasmide zur Herstellung

von konstitutiv exprimierenden Einzelklonen eingesetzt. Zusätzlich wurde das Konstrukt pSUPER *shBMI1* 5/6 genutzt, da es in früheren Versuchen die höchste Effizienz der Hemmung gezeigt hatte (persönliche Mitteilung von Kornelius Kerl und Werner Lutz).

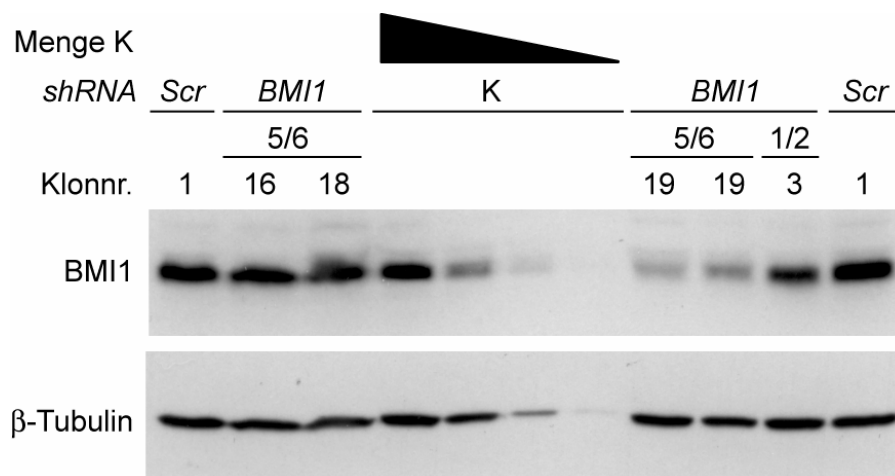
Für die Herstellung von konstitutiv exprimierenden *shBMI1*-Klonen wurden 1A3-Zellen mit dem jeweiligen Konstrukt sowie dem pBABE *PUR0*-Leervektor transfiziert, selektioniert und hochgezogen. Die Effizienz der Reduktion der BMI1-Menge in den erhaltenen Einzelklonen wurde mit Hilfe von Western Blots bestimmt. Insgesamt wurden 58 Klone (18 für 1/2, 19 für 3/4 und 21 für 5/6) analysiert und die BMI1-Proteinmenge jeweils mit der von parentalen 1A3-Zellen und pSUPER *shScrambled*-transfizierten Zellen (*Scr*, 23 Klone) verglichen. Die größte Effizienz im Western Blot zeigte der Klon pSUPER *shBMI1* 5/6 #19 (im Folgenden als Klon #19 bezeichnet). In Abbildung 21 ist ein Western Blot als Beispiel sowie das Ergebnis für Klon #19 dargestellt.



**Abbildung 21: Vergleich einiger Einzelklone, in denen *shRNA* gegen *BMI1* konstitutiv exprimiert wird, mit Kontrollzellen.** Aus verschiedenen Einzelklonen und 1A3-Zellen, die als Kontrolle dienten (K), wurden die Proteine isoliert. Nach SDS-PAGE und Western Blot konnten die BMI1-Proteinmengen miteinander verglichen werden. Zur Detektion von BMI1 und der Ladekontrolle  $\beta$ -Tubulin wurden entsprechende Antikörper genutzt. Als Beispiel sind die Ergebnisse von zwei Western Blots dargestellt. *Scr*...Einzelklone, in die pSUPER *shScrambled* transfiziert worden war. *BMI1*...Einzelklone, in die pSUPER *shBMI1* 1/2, 3/4 oder 5/6 transfiziert worden war. K...Kontroll- (1A3-)Zellen, die nicht transfiziert worden waren.

Um Artefakte des Western Blots auszuschließen und die konstante Regulation der BMI1-Menge zu überprüfen, wurde von Klon #19 nach einiger Zeit der Kultivierung ein weiteres Proteinlysate hergestellt und analysiert. Zur Quantifizierung wurden absteigende Mengen Proteinlysate (100%, 33%, 11% und 3,7%) von 1A3-Kontrollzellen eingesetzt. Das resultierte, wie erwartet, in der Abnahme der Proteinmengen für BMI1 und für die Ladekontrolle  $\beta$ -Tubulin (Abbildung 22). Die BMI1-Menge im ersten Lysat

(achte Bahn von links, Abbildung 22) von Klon #19 befindet sich zwischen 11% und 33% im Vergleich zu den Kontrollzellen. Das zweite, später hergestellte Lysat zeigt nur noch eine ungefähre Reduktion auf 33% (neunte Bahn von links, Abbildung 22). Die Effizienz der RNA-Interferenz scheint mit der Kultivierung der Zellen nachzulassen. Deshalb und aufgrund des Fehlens eines zweiten reproduzierbar, effizienten Klons, um mögliche unspezifische („Off-target“-) Effekte der *shRNA* auszuschließen, wurde die Arbeit mit RNA-Interferenz gerichtet gegen *BMII* eingestellt (siehe 5.1.4).



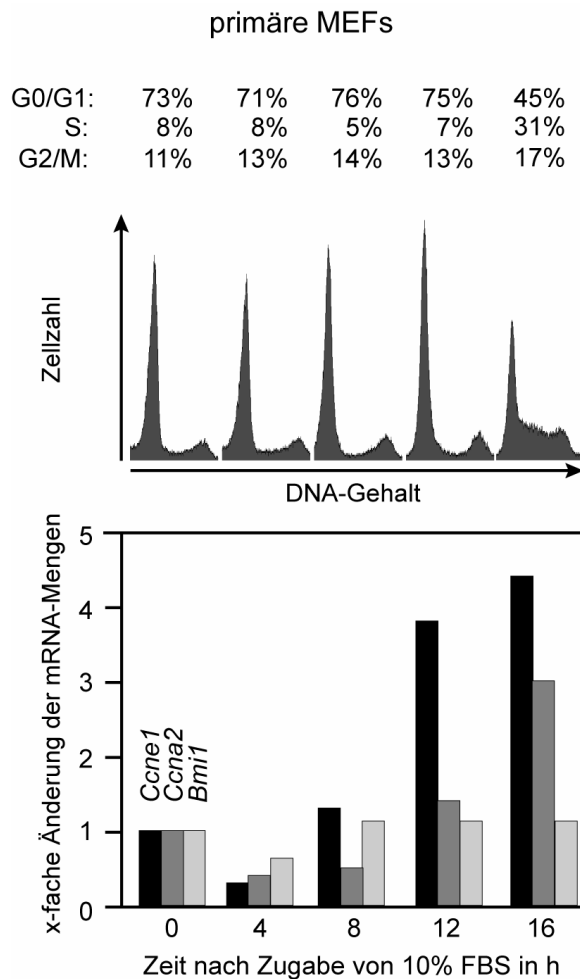
**Abbildung 22: Die Reduktion der BMI1-Proteinmenge im *shBMII* 5/6 Klon #19 beträgt zwischen 11 und 33% und nimmt mit fortgeschrittener Passagierung ab.** Zwei Proteinlysate von Klon #19 (achte und neunte Bahn: frühe und spätere Passage) wurden zusammen mit anderen Lysaten von *shBMII*- und *shScrambled*-Klonen aufgetrennt. Zur Abschätzung des Umfangs der Reduktion wurden verschieden stark verdünnte Proben (100%, 33%, 11% und 3.7%) von 1A3-Zellen, die als Kontrolle (K) dienten, mit aufgetragen. Nach SDS-PAGE, Western Blot und Detektion mit anti-BMI1- und zur Ladungskontrolle anti-β-Tubulin-Antikörpern konnte der Umfang der Reduktion abgeschätzt werden.

#### 4.2.5 Die Regulation von *BMII* während des Zellzyklus

E2F-1 ist essentiell für den Übergang von der G1- zur S-Phase im Zellzyklus (siehe 1.3.1). Es reguliert eine Vielzahl von Genen, die wichtig für den korrekten Ablauf des Zellzyklus sind und somit auch während verschiedener Phasen unterschiedlich stark exprimiert werden. Aufgrund dessen ist die Expression der Mehrheit der E2F-1-Zielgene während des Zellzykluses reguliert (Stand 2007). Ob diese Eigenschaft auch auf *BMII* zutrifft, sollte in verschiedenen Zelllinien analysiert werden.

Dazu wurden primäre MEFs für 36 Stunden in serumfreien Medium kultiviert, um ein Arretieren der Zellen in der G0/G1-Phase zu erlangen. Unmittelbar vor und zu

verschiedenen Zeitpunkten nach Beginn der Stimulation mit 10% FBS wurden Proben entnommen. Es wurden Zellen für ein Propidiumiodid-FACS fixiert und RNA isoliert.

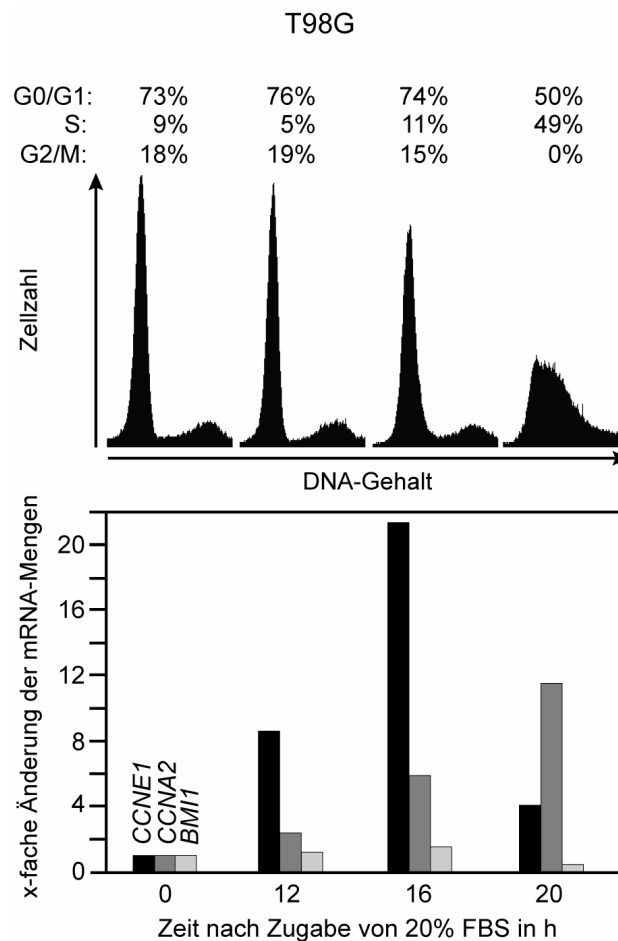


**Abbildung 23: Genexpressionänderungen von *Ccne1*, *Ccna2* und *Bmi1* beim und nach dem Wiedereintritt von primären MEFs in den Zellzyklus.** Primäre MEFs wurden für 36 Stunden in serumfreien Medium kultiviert und dann mit 10% FBS stimuliert. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden Zellen entweder für ein Propidiumiodid-FACS fixiert oder RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Im Propidiumiodid-FACS war der Wiedereintritt der Zellen in den Zellzyklus durch Erhöhung der Zellzahlen in der S-Phase zu erkennen. Die Änderung der Genexpressionen von *Ccne1*, *Ccna2* und *Bmi1* zu den verschiedenen Zeitpunkten konnte mittels qRT-PCRs bestimmt werden. Die Normalisierung erfolgte dabei auf die mRNA-Menge von *Rps16*, das für ein murines, ribosomales Protein kodiert.

Zu Beginn befanden sich 73% der Zellen in der G0/G1-Phase (Abbildung 23, oberer Teil). Mit Zugabe von 10% FBS sollte der Wiedereintritt der Zellen in den Zellzyklus erreicht werden. Nach 16 Stunden waren nur noch 45% der Zellen in der G0/G1- und 31% in der S-Phase (Abbildung 23, oberer Teil). Das zeigt, dass ein Großteil der Zellen sich gleichzeitig in den verschiedenen Phasen des Zellzykluses befunden hat. Mit dem Wiedereintritt der Zellen in den Zellzyklus war, wie erwartet, ein Anstieg der mRNA

von *Ccne1* zu erkennen. Etwas verzögert stellte sich auch eine Erhöhung der mRNA-Menge von *Ccna2* ein. Über den gesamten untersuchten Zeitraum war keine wesentliche Änderung der mRNA-Menge von *Bmi1* erkennbar (Abbildung 23, unterer Teil).

Um ein Zelltyp-spezifisches Phänomen auszuschließen, wurde dieser Versuch mit der humanen Glioblastomzelllinie T98G wiederholt (Abbildung 24).

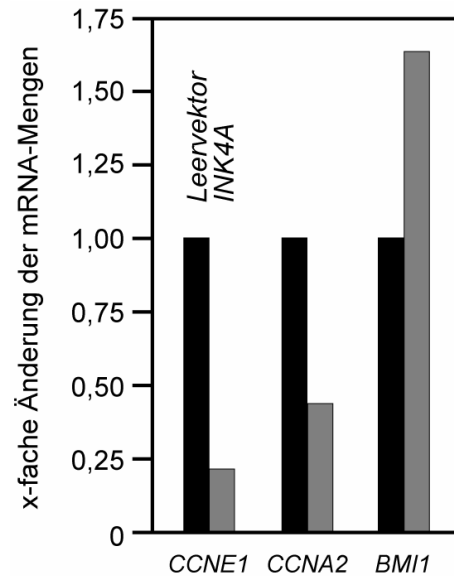


**Abbildung 24: Genexpressionänderungen von *CCNE1*, *CCNA2* und *BMI1* beim und nach dem Wiedereintritt von T98G-Zellen in den Zellzyklus.** T98G-Zellen wurden für 72 Stunden in serumfreien Medium kultiviert und dann mit 20% FBS stimuliert. Die weitere Aufbereitung und Analyse erfolgte analog zu den primären MEFs. Da T98G-Zellen humanen Ursprungs sind, erfolgte die Normalisierung der qRT-PCRs auf die mRNA-Menge von *RPS14*.

Die Zellen wurden für 72 Stunden in serumfreiem Medium gehalten. Diese Zeitspanne war nötig, um T98G-Zellen vollständig in der G0/G1-Phase zu arretieren (persönliche Kommunikation Björn von Eyss, AG Gaubatz). Durch Zugabe von 20% FBS erfolgte dann die Stimulation der Zellen. Wieder wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Zellen

zur FACS-Analyse fixiert bzw. aus ihnen RNA isoliert. Nach dem Hungern waren 73% der Zellen in der G0/G1-Phase, wohingegen 20 Stunden nach Zugabe von Wachstumsfaktoren sich nur noch 50% der T98G-Zellen in der G1-Phase und bereits 49% in der S-Phase befanden (Abbildung 24). Auch hier wurde deutlich, dass die Zellen durch die Behandlung synchronisiert wurden. Wie erwartet, steigt die mRNA-Menge von *CCNE1* mit dem Wiedereintritt der Zellen in den Zellzyklus an (Abbildung 24). Nachdem bei 16 Stunden ein Peak erreicht wurde, war nach 20 Stunden schon die Senkung der *CCNE1* mRNA-Menge erkennbar. Mit einer Verzögerung stieg die mRNA-Menge von *CCNA2* an, wohingegen auch in T98G-Zellen der Anteil an *BMII*-mRNA unverändert blieb (Abbildung 24).

Mit Hilfe einer Überexpression von *INK4A* sollte die Zellzyklusregulation weiter untersucht werden. Das Gen *INK4A* kodiert für den Zellzyklusinhibitor p16<sup>INK4A</sup>, der die durch Zyklin D-aktivierte Kinasen CDK4/6 inhibiert. Damit Zellen von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus eintreten können, ist die Phosphorylierung von pRB durch die aktive Kinase CDK4/6 nötig. Phosphoryliertes pRB dissoziiert von E2F, wodurch E2F-Zielgene exprimiert werden können. Somit sollten bei Überexpression von *INK4A* die mRNA-Mengen von E2F-Zielgenen verringert werden. Für diesen Versuch wurden humane Neuroblastomzellen IMR-32, die den ekotropen Rezeptor besaßen, eingesetzt. Diese wurden mit Viren, die entweder einen leeren Vektor oder *INK4A* enthielten, infiziert. Nach der Infektion wurden die Zellen geerntet, RNA isoliert und cDNA hergestellt. Diese cDNAs wurden mir von Verena Strieder (früheres Mitglied der Arbeitsgruppe) zur Verfügung gestellt.



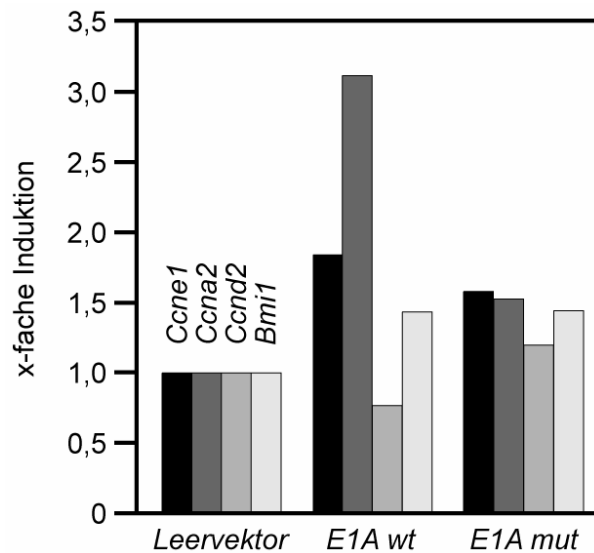
**Abbildung 25: Änderung der Genexpression von *CCNE1*, *CCNA2* und *BMI1* nach Infektion von IMR-32-Zellen mit Retroviren, die das Gen *INK4A* enthielten.** Retroviren wurden durch Transfektion von PHX-Zellen mit dem Konstrukt pBABE *HYGRO INK4A* oder pBABE *HYGRO* hergestellt. IMR-32-Zellen wurden mit diesen Retroviren infiziert, mit Hygromycin B selektioniert und dann die RNA der Zellen isoliert. Nach Umschreiben in cDNA konnten die ursprünglichen mRNA-Mengen von *CCNE1*, *CCNA2* und *BMI1* in qRT-PCRs ermittelt werden. Die Normalisierung erfolgte auf die mRNA von *RPS14*.

Die mRNA-Mengen von *CCNE1* und *CCNA2* sinken, wie erwartet, auf unter 25% bzw. unter 50% (Abbildung 25). Die relative Expression von *BMI1* bei Überexpression von *INK4A* in IMR-32 steigt stattdessen, womit eine Zellzyklusregulation widerlegt ist (Abbildung 25).

#### 4.2.6 Die Veränderung der E2F-1-Aktivität hat keine Wirkung auf die *BMI1*-Expression

Bislang wurde nur durch Überexpression von *E2F-1* die Menge seines Zielgens *BMI1* verändert. Generell müsste auch die Deregulation von E2F-1 Auswirkungen auf BMI1 haben. Um dies zu untersuchen, wurden NIH3T3 mit Viren, die entweder das Gen für das adenovirale Protein E1A (12S) (E1A wt) oder das Gen für mutiertes E1A 124A/135A (12S) (E1A mut) enthielten, infiziert. E1A bindet pRB und verhindert somit seine Assoziation mit E2F. Dadurch kommt es zur Aktivierung von E2F-Zielgenen. Durch Mutation der Aminosäuren 124 und 135 zu jeweils Alanin verliert E1A seine Fähigkeit, pRB zu binden. Damit sollte dies eine Aufhebung der Aktivierung

von E2F-Zielgenen zur Folge haben. Zur Kontrolle wurden NIH3T3 auch mit Viren, die einen leeren Vektor besaßen, infiziert. Nachdem die Selektion mit Puromyzin abgeschlossen war, wurde die RNA der Zellen isoliert und cDNA synthetisiert. Die Quantifizierung wurde wieder mittels qRT-PCRs durchgeführt.



**Abbildung 26: Genexpressionsänderungen von *Ccne1*, *Ccna2*, *Ccnd2* und *Bmi1* durch Infektion von NIH3T3 mit *E1A wt* oder *E1A mut* enthaltenen Retroviren.** Nach Transfektion von PHX-Zellen mit pBABE *PUR*O-Leervektor, pBABE *PUR*O *E1A wt* oder pBABE *PUR*O *E1A mut* wurden Retroviren hergestellt. Mit diesen wurden NIH3T3-Zellen infiziert und mit Puromyzin selektioniert. Aus den Zellen wurde die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und die ursprünglichen mRNA-Mengen der Gene in qRT-PCRs ermittelt. Mit *Rps16* erfolgte bei diesen Mauszellen die Normalisierung.

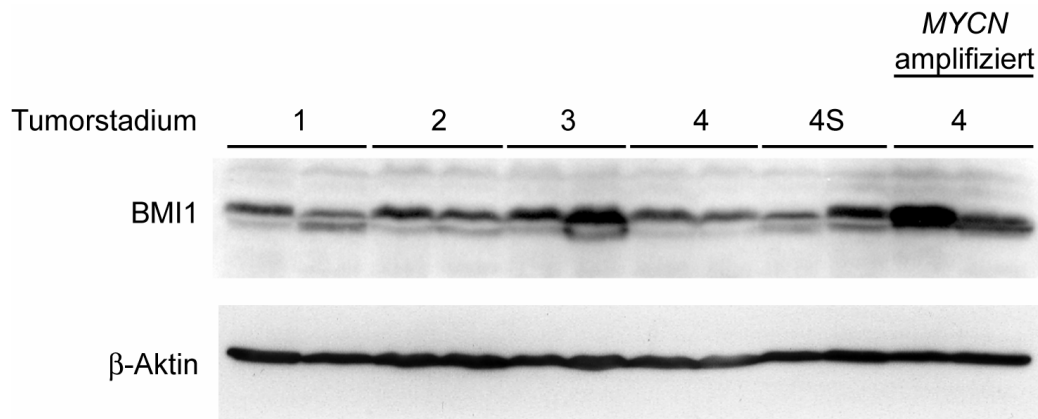
Bei Expression von *E1A wt* ist eine moderate Induktion der mRNA-Mengen von *Ccne1* und *Ccna2* mit ca. 1,8-fach bzw. 3-fach bei Expression von *E1A wt* zu sehen (Abbildung 26). Die *Ccnd2* und *Bmi1* mRNAs blieben dagegen nahezu unverändert. Bei Expression von *E1A mut* ist wie erwartet für *Ccna2* keine Aktivierung mehr zu sehen. Die mRNA-Menge von *Ccne1* veränderte sich nur geringfügig und auf die *Ccnd2* und *Bmi1* mRNAs hatte die Expression von *E1A mut* keinen Einfluss (Abbildung 26). Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die Erhöhung der freien, endogenen Menge von E2Fs vermutlich keinen Einfluss auf die *BMII*-Expression hat. Da sich die Expression des E2F-1-Zielgens *Ccne1* jedoch nur geringfügig änderte, müsste der Versuch für eine konkrete Aussage in dieser und anderen Zelllinien wiederholt werden. Bis dahin kann nicht ausgeschlossen werden, dass kein Anstieg der mRNA-Mengen von *BMII* bei Expression von *E1A wt* erkennbar war, weil sich die freien, endogenen E2F-Mengen nur geringfügig änderten.



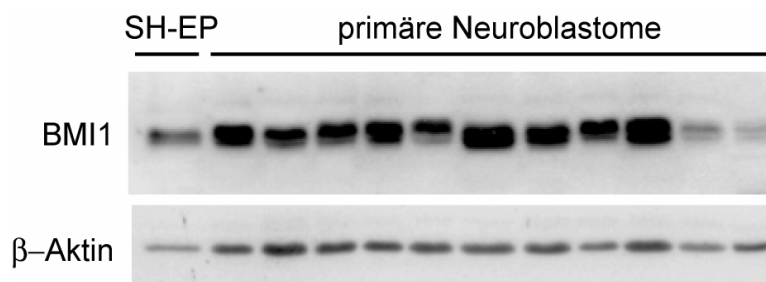
#### 4.2.7 Hohe BMI1-Mengen in humanen, primären Neuroblastomen

Nachdem eine Reihe von biochemischen Untersuchungen über BMI1 durchgeführt worden waren, sollte nun festgestellt werden, in welchem zellulären Programm BMI1 eine Rolle spielt und inwiefern die Regulation durch E2F-1 dafür wichtig ist. Es war bekannt, dass eine Reihe von E2F-regulierten Genen in verschiedenen Krebsarten, einschließlich Neuroblastomen, überexprimiert wird (Schwab, 2004; Strieder and Lutz, 2003). Des Weiteren korreliert die Expression mehrerer E2F-Zielgene mit einer schlechten Prognose für Patienten mit Neuroblastomen (Schwab, 2004; Brodeur et al., 1984; Strieder and Lutz, 2003). Die Initiation der Tumorbildung ist weitgehend ungeklärt, wohingegen die Bildung aus Stammzellen der Neuralleiste allgemein anerkannt ist (Ishikawa, 1977; Ciccarone et al., 1989; Dimitroulakos et al., 1994; Ross et al., 1995). BMI1 ist essentiell für die Selbsterneuerung von neuronalen und leukämischen Stammzellen, weshalb es für die Bildung von Neuroblastomen von Bedeutung sein könnte.

Aufgrund dessen lag es nahe, die BMI1-Mengen in Neuroblastomen zu analysieren. Professor Holger Christiansen und Dr. Bernd Berwanger von der Kinderklinik Marburg stellten uns 68 Tumorlysate aus primären Neuroblastomen zur Verfügung. Die Tumore waren in verschiedene Tumorstadien eingeteilt und es war bekannt, ob eine *MYCN*-Amplifikation, ein Kriterium für eine schlechte Prognose, vorlag. Vorhergehende histochemische Untersuchungen hatten gezeigt, dass die Neuroblastome, aus denen die Lysate gewonnen worden waren, weniger als 5% Nichttumorzellen enthielten (Berwanger et al., 2002). Mittels Western Blots wurden die BMI1-Proteinmengen in allen Lysaten bestimmt. In Abbildung 27 ist ein repräsentativer Western Blot als Beispiel zu sehen. Die BMI1-Mengen in primären Neuroblastomen wurden mit der Proteinmenge von BMI1 in SH-EP-Zellen verglichen (Abbildung 28).



**Abbildung 27: BMI1-Proteinmengen einer Auswahl an Lysaten aus primären Neuroblastomen, die in verschiedene Tumorstadien eingeteilt werden können.** Lysate aus primären Neuroblastomen wurden von Holger Christiansen und Bernd Berwanger zur Verfügung gestellt. Diese Tumore können in verschiedene Tumorstadien eingeteilt werden. Dabei geht Stadium 1 eher mit einer guten Prognose einher, wohingegen Stadium 4 eine schlechte Prognose bedeutet. Ein weiteres Einteilungskriterium ist der *MYCN*-Status, da eine *MYCN*-Amplifikation ein Marker für eine schlechte Prognose darstellt. BMI1 wurde nach SDS-PAGE und Western Blot mittels anti-BMI1-Antikörper detektiert. Als Normalisierung erfolgte die Detektion von β-Aktin mit anti-β-Aktin-Antikörpern.



**Abbildung 28: Vergleich der BMI1-Mengen von primären Neuroblastomen mit der von humanen Neuroblastomzellen SH-EP.** Die Lysate von primären Neuroblastomen wurden mit einem Lysat aus SH-EP-Zellen zusammen bei der SDS-PAGE aufgetragen. Nach Western Blot und Detektion von BMI1 und der Ladekontrolle β-Aktin mit anti-BMI1- bzw. anti-β-Aktin-Antikörpern konnten die Proteinmengen an BMI1 verglichen werden.

So konnte für alle 68 untersuchten Lysate aus primären Neuroblastomen die BMI1-Proteinmenge eingeschätzt werden. Demnach konnten 94% der untersuchten Neuroblastome im Vergleich zu SH-EP-Zellen als BMI1-positiv eingeschätzt werden und eine Rolle von BMI1 in Neuroblastomen liegt nahe (Tabelle 5). Die letzten beiden Bahnen in Abbildung 28 zeigen Beispiele für Neuroblastome, die als BMI1-negative Tumore eingestuft wurden. Ein Unterschied zwischen den Tumorstadien oder aufgrund des Status von *MYCN* konnte nicht festgestellt werden (Tabelle 5 und Tabelle 6).

**Tabelle 5: Anzahl der untersuchten primären Neuroblastome aus den verschiedenen Tumorstadien, die als BMI1-positiv eingestuft wurden.** Durch Vergleich mit SH-EP-Zellen wurden die primären Neuroblastome als BMI1-positiv oder –negativ eingeschätzt.

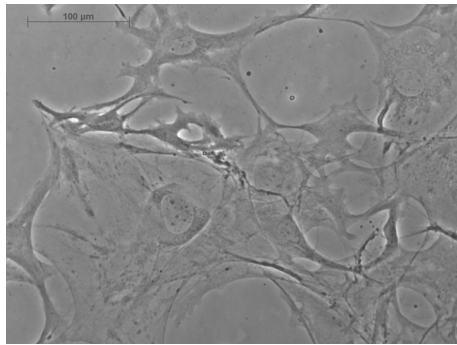
Tumor-stadium	Anzahl der Tumore	Anzahl von BMI1-positiven Tumoren	Prozentanteil von BMI1-positiven Tumoren
1	14	14	100
2	6	6	100
3	15	14	93
4	29	26	90
4S	4	4	100
Summe	68	64	94

**Tabelle 6: Anzahl der untersuchten primären Neuroblastome mit verschiedenem MYCN-Status, die als BMI1-positiv eingestuft wurden.** Der MYCN-Status wird als prognostischer Marker genutzt: eine Amplifikation von MYCN steht für eine schlechte Prognose.

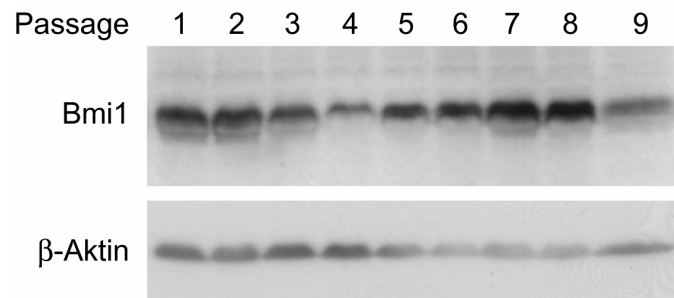
MYCN-Status	Anzahl der Tumore	Anzahl von BMI1-positiven Tumoren	Prozentanteil von BMI1-positiven Tumoren
eine Kopie	56	52	93
amplifiziert	12	12	100

#### 4.2.8 Die Rolle von BMI1 in der Seneszenz

Es war bekannt, dass *BMI1* während der Seneszenz herunterreguliert wird und dass eine Repression von E2F-Zielgenen erfolgt (Itahana et al., 2003; Narita et al., 2003). Deshalb lag es nahe, die Rolle der Interaktion von E2F-1 und BMI1 in diesem zellulären Programm zu untersuchen. Dazu sollten die BMI1-Mengen während der Seneszenz überprüft werden. Primäre MEFs wurden so lange passagiert, bis sie deutliche Anzeichen von Seneszenz zeigten. Dies war eine vergrößerte, flache Zellmorphologie, wie sie bei primären MEFs der Passage 9 erkennbar war (Abbildung 29). Während dessen wurde stets aus einem Teil der Zellen die RNA isoliert und die Proteine extrahiert. Die Bmi1-Mengen in MEFs der verschiedenen Passagen wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot ermittelt. Die Proteinmengen schwankten zwar, zeigten jedoch nicht die zu erwartende Verringerung bei höheren Passagen (Abbildung 30). Um dies auch auf mRNA-Ebene zu untersuchen, wurden qRT-PCRs mit den cDNAs durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde hier die Veränderung der mRNA-Menge von *INK4A* überprüft.

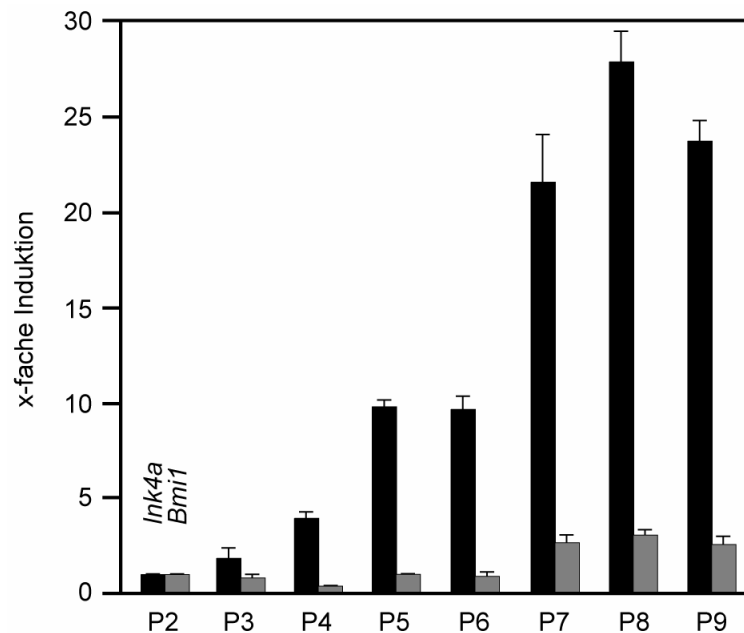


**Abbildung 29: Die vergrößerte, flache Morphologie von Mausembryofibroblasten der Passage 9.** Primäre Mausembryofibroblasten wurden so lange passagiert, bis eindeutige, morphologische Veränderungen erkennbar waren und die Proliferation deutlich reduziert war.



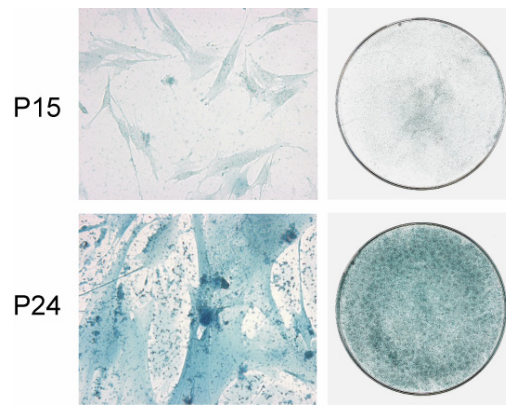
**Abbildung 30: Die Bmi1-Mengen in verschiedenen Passagen von primären MEFs ändern sich nur unwesentlich.** Während der Passagierung von primären MEFs wurden aus einem Teil der Zellen die Proteine isoliert. Diese wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und Bmi1 nach Western Blot mit anti-BMI1-Antikörper, die auch Bmi1 der Maus erkennen, detektiert. Als Ladungskontrolle diente β-Aktin.

Wie erwartet stieg die Expression von *INK4A*, wenn primäre MEFs seneszent wurden (Abbildung 31). Die mRNA-Menge von *Bmi1* blieb hingegen fast unverändert. Da die Ergebnisse der Literatur mit unseren primären MEFs nicht reproduzierbar waren, wurden weitergehende Experimente gestoppt.

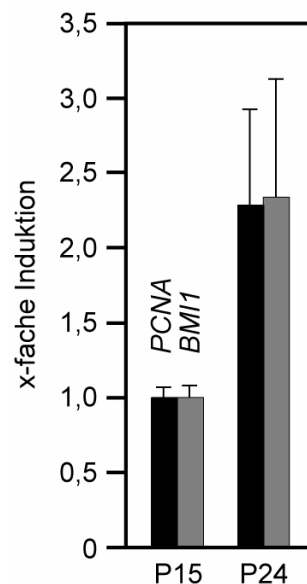


**Abbildung 31: Erhöhung der mRNA-Mengen von *Ink4a* mit fortgeschrittener Passagierung von primären MEFs, während die *Bmi1*-mRNA entgegen der Erwartung sogar geringfügig ansteigt.** Primäre Mausembryofibroblasten wurden passagiert und dabei stets aus einem Teil der Zellen die RNA isoliert. Diese wurde in cDNA umgeschrieben und die ursprünglichen mRNA-Mengen von *Ink4a* und *Bmi1* durch qRT-PCRs ermittelt. Die Normalisierung erfolgte auf die mRNA-Menge von *Rps16*.

Auch von humanen, diploiden Fibroblasten wie WI-38-Zellen ist bekannt, dass sie nach mehrfacher Passagierung seneszent werden. Um zu überprüfen, ob es in diesen Zellen im Verlauf der Seneszenz zu einer Abschaltung der *BMII*-Expression kommt, wurden WI-38-Zellen bis zur Seneszenz passagiert. WI-38-Zellen der Passage 14, die noch keinerlei Anzeichen von Seneszenz zeigten und stark proliferierten, erhielten wir von der Arbeitsgruppe Elsäßer. Nach einer Passagierung zur Expansion wurde bei Passage 15 (P15) und später bei Passage 24 (P24) RNA isoliert. Der Nachweis seneszenten Zellen erfolgte durch histochemische Färbung der Seneszenz-assoziierten  $\beta$ -Galaktosidase (SA- $\beta$ -Gal). Die Anreicherung von SA- $\beta$ -Gal in WI-38-Zellen in Passage 24 durch stärkere Blaufärbung ist deutlich erkennbar (Abbildung 32). Darüber hinaus ist auch die größere, flache Zellmorphologie bei gleicher Vergrößerung zu sehen (Abbildung 32).



**Abbildung 32: Anfärbung der Seneszenz-assoziierten  $\beta$ -Galaktosidase (SA- $\beta$ -Gal) in WI-38-Zellen der Passagen 15 und 24.** WI-38-Zellen wurden passagiert, bis eine deutliche Veränderung der Zellmorphologie und verringerte Proliferation erkennbar war. Dann wurde in diesen Zellen und in WI-38 einer zeitigen Passage gleichzeitig die SA- $\beta$ -Gal angefärbt. Die beiden linken Abbildungen stellen eine 200fache Vergrößerung der Zellen dar.



**Abbildung 33: Änderung der Genexpressionen von *PCNA* und *BMII* in WI-38-Zellen bei längerer Passagierung.** Aus WI-38-Zellen der Passage 15 und später bei der Passage 24 wurde RNA isoliert. Die RNA-Proben wurden in cDNA umgeschrieben und mittels qRT-PCRs die ursprünglichen mRNA-Mengen von *PCNA* und *BMII* bestimmt. Die mRNA-Menge von *RPS14* wurde zur Normalisierung herangezogen.

Als weitere Positivkontrolle wurden die mRNA-Mengen von *PCNA* (**P**roliferating **C**ell **N**uclear **A**ntigen) mittels qRT-PCR überprüft. Es war bekannt, dass *PCNA* während der Seneszenz gehemmt wird (Narita et al., 2003). Dies traf jedoch nicht auf die *PCNA*-mRNA in den von mir untersuchten WI-38-Zellen zu (Abbildung 33). Für die *BMII* mRNA-Menge ist statt einer erwarteten Senkung eine moderate Erhöhung zu sehen

(Abbildung 33). Demnach findet in den von uns verwendeten Zellen im Verlauf der Seneszenz keine Senkung der *BMII*-Expression statt.

### 4.3 Die Regulation der *FOXOs* durch E2F-1 und ihre Rolle in der E2F-1-induzierten Apoptose

Da ebenfalls für *FOXO1* und *FOXO3a* die direkte Regulation durch E2F-1 in Neuroblastomzellen gezeigt werden konnte, sollte nun diese Interaktion in verschiedenen Zelllinien weiter untersucht werden. Außerdem sollte geklärt werden, ob FOXOs auch durch physiologische E2F-1-Aktivität induziert werden können und welche Rolle diese Regulation für die E2F-1-induzierte Apoptose spielt.

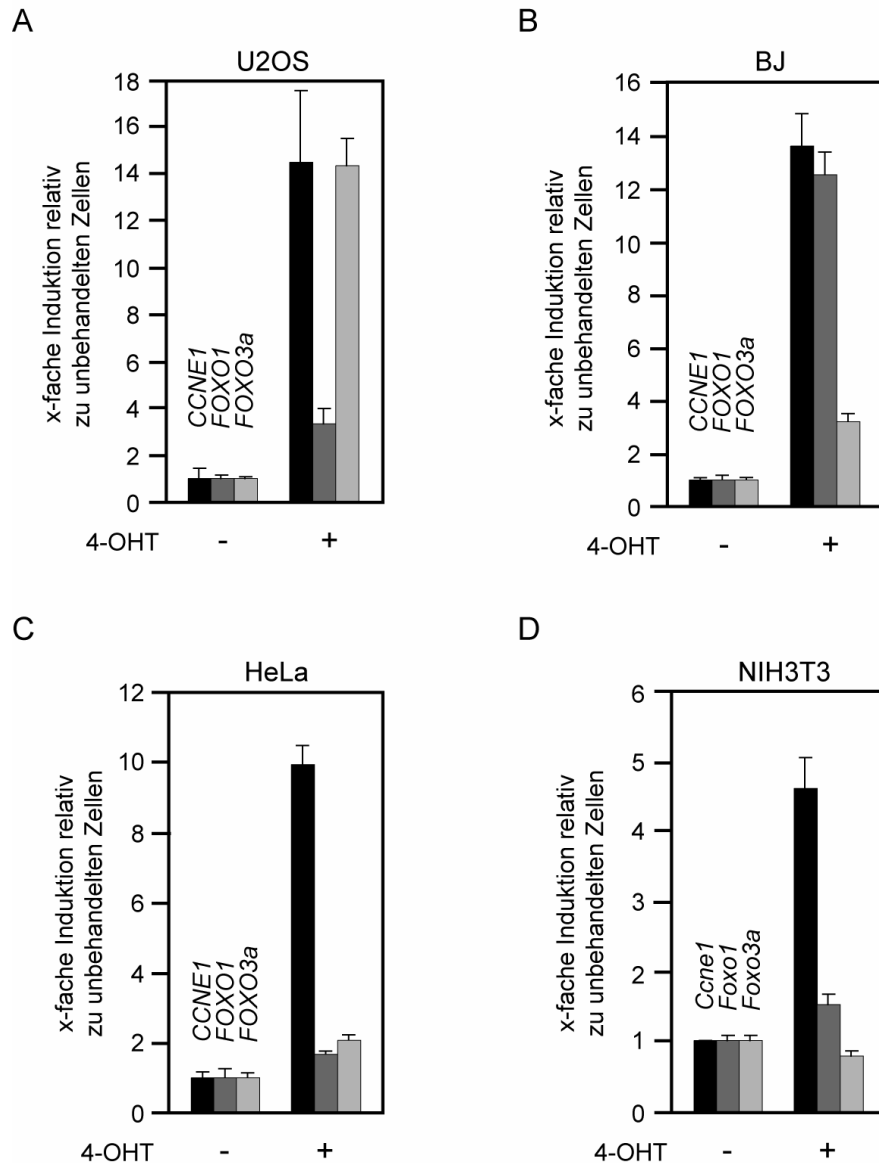
#### 4.3.1 Die Regulation der *FOXOs* durch E2F-1 in verschiedenen Zelllinien

Im cDNA-Microarray (Tabelle 8, Anhang) wurden auch FOXO-Transkriptionsfaktoren als mögliche E2F-1-Zielgene gefunden. Zu Beginn meiner Arbeit war schon gezeigt worden, dass *FOXO1* und *FOXO3a* in Neuroblastomzellen direkte Zielgene von E2F-1 sind und dass E2F-1 *in vivo* an den *FOXO1*-Promotor bindet.

Nun sollte festgestellt werden, ob die Regulation von FOXOs durch E2F-1 nur in Neuroblastomzellen stattfindet, oder ob dies ein generelles Phänomen ist. Dazu wurden humane U2OS Osteosarkomzellen, humane, diploide BJ Vorhaut-Fibroblasten und humane HeLa Zervixkarzinomzellen, die den ekotropen Rezeptor stabil exprimierten, sowie NIH3T3 Mausfibroblasten, die den Rezeptor von Natur aus besaßen, mit Retroviren infiziert. Diese Viren wurden nach Transfektion von PHX-Zellen mit pBABE *PUR*O *HA-ER-E2F-1* hergestellt. Nach der Infektion wurden die Zellen mit Puromycin selektioniert und für 14 Stunden mit 200 nM 4-OHT oder Ethanol inkubiert. Anschließend wurde RNA isoliert, cDNA hergestellt und die mRNA-Mengen von *CCNE1*, *FOXO1* und *FOXO3a* bzw. ihrer Mausehomologen mittels qRT-PCR ermittelt. Der Erfolg der Infektion ist jeweils an der Aktivierung des etablierten E2F-Zielgenes *CCNE1* bzw. *Ccne1* zu erkennen (Abbildung 34 A-D). In U2OS Osteosarkomzellen als auch in BJ Vorhaut-Fibroblasten werden *FOXO1* und *FOXO3a* durch E2F-1 aktiviert (Abbildung 34). In U2OS ist die Regulation von *FOXO1* dreifach, während *FOXO3a* mit 14-fach eine sehr starke Aktivierung erfährt. Die *FOXO1* mRNA wird in BJ-Zellen mehr als 12-fach induziert im Vergleich zu einem dreifachen Anstieg der mRNA-Mengen von *FOXO3a*. Im Gegensatz dazu werden beide Gene in humanen HeLa



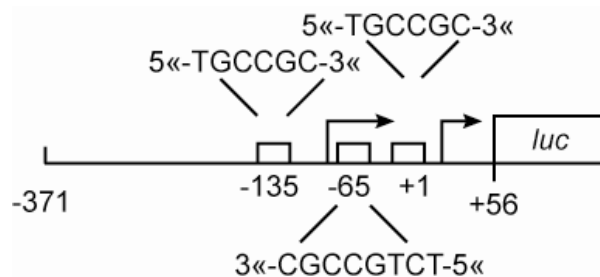
Zervixkarzinomzellen und NIH3T3 Mausfibroblasten durch E2F-1 nicht reguliert (Abbildung 34). Die Regulation von FOXO1 und FOXO3a durch E2F-1 könnte somit spezifisch für ein Gewebe sein.



**Abbildung 34: Genexpressionsänderungen von *CCNE1*, *FOXO1* und *FOXO3a* bzw. den Mausorthologen bei Aktivierung von E2F-1-ER mit 4-OHT in verschiedenen Zelllinien.** PHX-Zellen wurden mit pBABE *PURU HA-ER-E2F-1* transfiziert und dann die entstandenen Retroviren zur Infektion genutzt. U2OS-, BJ- und HeLa-Zellen, die das Gen für den ekotropen Rezeptor stabil exprimierten und NIH3T3, die von Natur aus diese Rezeptoren besaßen, wurden mit diesen Retroviren infiziert. Nach der Selektion mit Puromycin, wurden die Zellen für 14 Stunden mit 200 nM 4-OHT behandelt und dann RNA isoliert. Durch Umschreiben in cDNA und qRT-PCRs konnten die ursprünglichen mRNA-Mengen von *CCNE1*, *FOXO1* und *FOXO3a* bzw. den Mausomologen ermittelt werden. Zur Normalisierung wurden für die humanen Zellen die mRNA von *RPS14* und für die NIH3T3 die mRNA von *Rps16* bestimmt.

### 4.3.2 Die Aktivierung von *FOXO1* durch Bindung von E2F-1 an den *FOXO1*-Promotor

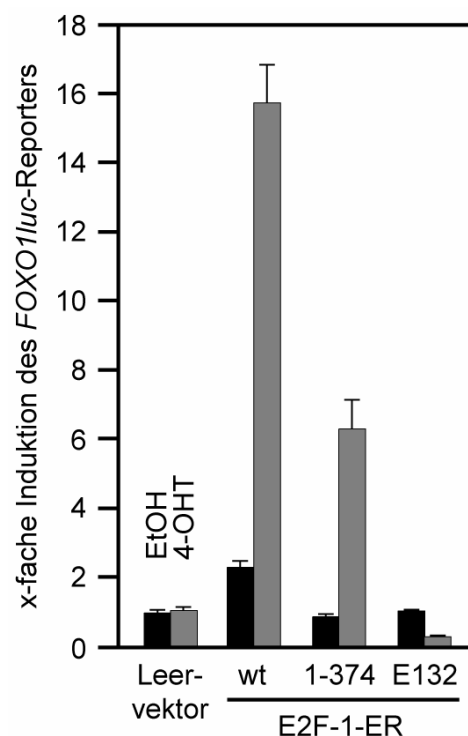
Da E2F-1 die Transkriptionsfaktoren FOXO1 und FOXO3a direkt reguliert und Chromatin-Immunpräzipitationsexperimente zeigten, dass E2F-1 den *FOXO1*-Promotor *in vivo* bindet (persönliche Mitteilung von Christine Gessner), wurden E2F-Bindestellen in den Promotoren gesucht. Sowohl im *FOXO1*- als auch im *FOXO3a*-Promotor des Menschen liegen proximal zum Transkriptionsstart mehrere Sequenzen, die starke Ähnlichkeit mit der Konsensus-E2F-Bindungsstelle aufweisen (Abbildung 35 und Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 35:** Schematische Darstellung der *FOXO1*-Promotorsequenz mit den Konsensus-E2F-Bindestellen, die in den Vektor pGL3 basic vor das Luziferase-Gen kloniert wurde. Die drei E2F-Bindungsstellen mit der jeweiligen Sequenz und der Position im *FOXO1*-Promotor sind hervorgehoben.

Entsprechenden Sequenzen finden sich auch in den Promotoren der Mausgene (Daten nicht gezeigt). Um zu zeigen, dass E2F-1 über diesen Promotorbereich die Expression von *FOXO1* aktiviert, wurden Reportergenanalysen durchgeführt. Außerdem sollte untersucht werden, wie sich der Einsatz verschiedener E2F-1-Mutanten auf die Stimulierung der FOXOs auswirkt. Dazu wurde ein Teil des *FOXO1*-Promotors vor das Luziferasereportergen des Vektors pGL3 basic kloniert (Christine Gessner, früheres Mitglied der Arbeitsgruppe, Abbildung 35), wodurch das Konstrukt pGL3 *FOXO1* / *FOXO1luc* entstand. Dieses Konstrukt wurde zu gleichen Teilen mit verschiedenen E2F-1-ER-Konstrukten bzw. einem leeren Kontrollvektor und ein Zehntel der DNA an pCMV *lacZ* in SH-EP-Zellen kotransfiziert. Neben dem wt E2F-1-ER wurde mit E2F-1-ER 1-374 ein C-terminal verkürztes E2F-1-Protein, welches dominant-negativ wirken sollte, genutzt. Diesem Protein fehlen ein Teil der Transaktivierungsdomäne und die darin enthaltene pRB-Bindungsdomäne. Es kann damit zwar DNA binden und mit Wildtyp-E2F-1 um DNA-Bindungsstellen

kompetitieren, jedoch keine Aktivierung mehr bewirken. Da E2F-1-ER 1-374 kein Pocketprotein mehr binden kann, verdrängt es möglicherweise auch reprimierende E2F/Pocketprotein-Komplexe von Zielpromotoren. Dies wäre durch eine Derepression und damit Aktivierung von Zielgenen erkennbar. E132 ist eine Punktmutante von E2F-1, die zur DNA-Bindung nicht mehr fähig ist, also Zielgene nicht mehr regulieren können sollte. Für jeden Ansatz wurden Triplikate angesetzt und nach Transfektion wurden die Zellen 25 Stunden mit 200 nM 4-OHT behandelt. Die Zellen wurden lysiert, die Reporteraktivitäten im Luziferase-Assay gemessen und gegen die Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase normalisiert.

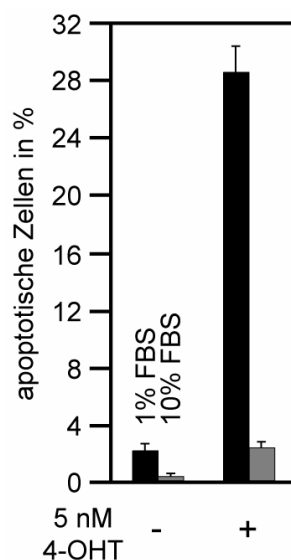


**Abbildung 36: Luziferase-Aktivitäten in SH-EP-Zellen nach Kotransfektion von *FOXO1luc* und Konstrukten, die Gene für *E2F-1-ER* oder verschiedene Mutanten enthielten.** SH-EP-Zellen wurden mit *FOXO1luc* und pcDNA3 (Leervektor), pCMV *E2F-1-ER wt*, pCMV *E2F-1-ER 1-374* oder pCMV *E2F-1-ER E132* kotransfiziert. Außerdem bestand jeder Transfektionsansatz zu einem Zehntel der DNA aus pCMV *lacZ*. Nach der Transfektion wurden die Zellen auf jeweils drei Schalen aufgeteilt und für 25 Stunden mit 200 nM 4-OHT oder Ethanol behandelt. Dann wurden Lysate hergestellt, die Luziferase-Aktivität ermittelt und gegen die Aktivität der enthaltenen  $\beta$ -Galaktosidase normalisiert.

In SH-EP-Zellen aktivierte Wildtyp-E2F-1 den *FOXO1*-Promoter 15-fach und E2F-1 1-374 wirkte ebenfalls induzierend (Abbildung 36). Dagegen verringerte sich die *FOXO1*-Reporteraktivität bei Aktivierung von E2F-1 E132 leicht (siehe 5.2.2).

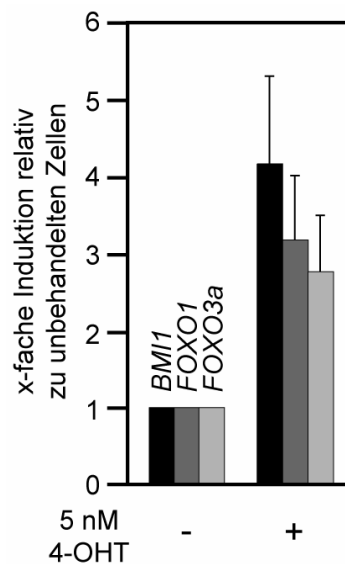
### 4.3.3 Die Induktion von *FOXOs* durch physiologische E2F-1-Aktivität

In den bisher gezeigten Experimenten erfolgte die Aktivierung des E2F-1-ER-Fusionsproteins durch Zugabe von 200 nM 4-OHT. Unter diesen Bedingungen wird das gesamte ektopisch exprimierte Fusionsprotein aktiviert, wodurch es wahrscheinlich zu einer unphysiologisch hohen Menge an aktivem E2F-1 kommt. Es wäre deshalb möglich, dass die in Abbildung 34 beobachtete Induktion der *FOXO*-Gene eine Konsequenz der Überexpression von E2F-1 ist und endogenes E2F-1 gar nicht in der Lage ist, die *FOXOs* zu aktivieren. Diese unphysiologisch hohe Menge an aktivem E2F-1 nach Behandlung der Zellen mit 200 nM 4-OHT resultiert u. a. in der massiven Apoptose der Zellen (Daten nicht gezeigt). Um eine physiologische E2F-1-Aktivität zu ermitteln, wurde die Konzentration von 4-OHT bei 1% FBS in 1A3-Zellen titriert (persönliche Mitteilung Jenny Hofmann). Dabei sollte so wenig E2F-1 aktiviert werden, dass gerade noch pro-apoptotische E2F-1-Zielgene induziert werden konnten. Dies wurde durch Bestimmung des Anteils apoptotischer Zellen mittels Propidiumiodid-FACS überprüft (Daten von Jenny Hofmann). Eine Konzentration von 5 nM 4-OHT bei 1% FBS bewirkt eine geringe E2F-1-Aktivierung, die jedoch noch ausreicht, um bei einem deutlichen Anteil der Zellen Apoptose zu induzieren (Abbildung 37 und Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 37: Induktion der Apoptose von 1A3-Zellen, die mit 1% FBS kultiviert und mit nur 5 nM 4-OHT behandelt wurden.** Die Kultivierung von 1A3-Zellen erfolgte in Medium mit 10% oder 1% FBS. Für 36 Stunden wurde entweder 5 nM 4-OHT oder Ethanol hinzugegeben. Dann erfolgte die Fixierung der Zellen und Bestimmung des Anteils apoptotischer Zellen mittels Propidiumiodid-FACS.

Unter Verwendung dieser Konzentration sollte nun geklärt werden, ob *FOXOs* auch durch nahezu physiologische E2F-1-Aktivität induziert werden können. 1A3-Zellen wurden in 1% bzw. 10% FBS für ca. 24 Stunden kultiviert. Dann wurde entweder Ethanol oder 5 nM 4-OHT zugegeben, nach 13 Stunden erfolgte die RNA-Isolation und nach 36 Stunden wurden Zellen für Propidiumiodid-FACS fixiert. Ohne Zugabe von 4-OHT sind kaum apoptotische Zellen vorhanden (Abbildung 37). Bei Gabe von 4-OHT und Anwesenheit von 10% FBS verändert sich der Anteil an Apoptose nicht. Befinden sich die Zellen jedoch in Medium mit nur 1% FBS, werden ca. 28% der Zellen bei Zugabe von 5 nM 4-OHT apoptotisch (Abbildung 37). Damit konnte bestätigt werden, dass mit 5 nM 4-OHT eine moderate Aktivierung von E2F-1-ER erreicht wurde. Die mRNA-Mengen von *BM11*, *FOXO1* und *FOXO3a* der Zellen bei 1% FBS und 5 nM 4-OHT im Vergleich zu den mit Ethanol-behandelten Zellen wurden mit Hilfe von RT-PCRs quantifiziert. Alle drei E2F-1-Zielgene zeigten eine ca. 3-4-fache Erhöhung ihrer mRNA-Mengen durch eine moderate E2F-1-Aktivierung mit 5 nM 4-OHT (Abbildung 38). Auch die mRNA-Mengen von *CCNE1* wurden überprüft und wiesen eine Erhöhung nach Induktion mit 5 nM 4-OHT auf (Daten nicht gezeigt).



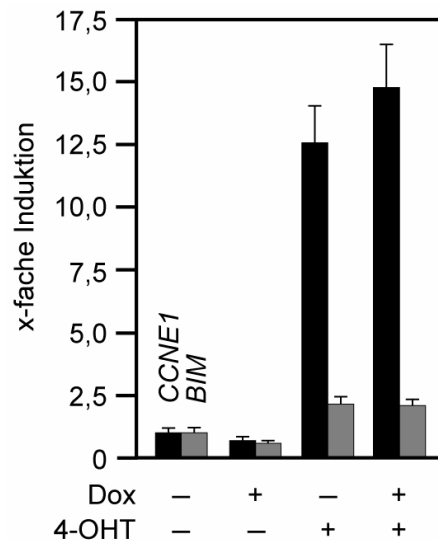
**Abbildung 38: Genexpressionsänderung von *BM11*, *FOXO1* und *FOXO3a* nach Induktion von E2F-1-ER mit nur 5 nM 4-OHT in 1A3-Zellen.** 1A3-Zellen wurden bei 1% FBS kultiviert und für 13 Stunden mit 5 nM 4-OHT oder Ethanol behandelt. Dann wurde die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und die ursprünglichen mRNA-Mengen von *BM11*, *FOXO1* und *FOXO3a* mittels qRT-PCRs bestimmt. Zur Normalisierung erfolgte ein Abgleich auf die mRNA-Menge von *RPS14*.

#### 4.3.4 Die Regulation der *FOXOs* ist für die E2F-1-induzierte, neuronale Apoptose nicht essentiell

Da verschiedene Punkte (siehe 1.5.6) auf eine Rolle der FOXOs in der E2F-1-induzierten Apoptose hinwiesen, sollte dies näher untersucht werden. Dazu wurden TOR7dnF-Zellen verwendet, in denen E2F-1 und dnFOXO aktiviert bzw. induziert werden können (persönliche Mitteilung von Kornelius Kerl und Katrin Killmer). Durch Vorversuche einer Kollegin war bekannt, dass GFP-gekoppeltes FOXO in diesen Zellen zum Großteil im Zellkern zu finden ist (persönliche Mitteilung von Christine Gessner). Entsprechend liegt in TOR7dnF-Zellen keine Inaktivierung der endogenen FOXO-Proteine, zumindest nicht auf der Ebene des Kernexports als wichtigster Ebene der negativen Regulation von FOXOs, vor. Dies war die Voraussetzung, um diese Zellen zur Untersuchung der Funktion von FOXO zu verwenden. Die Induktion von dnFOXO durch Zugabe von Doxyzyklin wurde von einer Mitarbeiterin auf Proteinebene mittels Western Blots überprüft und bestätigt (persönliche Mitteilung von Katrin Killmer). Zur Untersuchung der Apoptose wurden dann TOR7dnF-Zellen für 10 Tage bei 1% FBS mit Doxyzyklin und/oder 5 nM 4-OHT behandelt. Mittels einer Giemsa-Färbung konnten die verbliebenen Zellen gefärbt und so ein Vergleich der Apoptoseraten gemacht werden. Dabei zeigte sich kein Unterschied zwischen den Zellen, die nur mit 4-OHT und denen, die mit 4-OHT und Doxyzyklin behandelt wurden (persönliche Mitteilung von Katrin Killmer).

Da *BIM* ein pro-apoptotisches Zielgen von sowohl E2F-1 als auch den FOXOs ist, sollte eine mögliche Verbindung bei der Aktivierung von *BIM* untersucht werden. Vorstellbar wäre zum Beispiel, dass E2F-1 die *FOXOs* induziert und diese dann ihrerseits eine Aktivierung von *BIM* bewirken. Diese Hypothese wurde durch die Beobachtung unterstützt, dass in neuronalen PC12-Zellen E2F-1 *BIM* nicht direkt aktiviert, sondern ein Zwischenprodukt benötigt wird (Biswas et al., 2005). In NIH3T3 dagegen, in denen hier keine Regulation der *FOXOs* durch E2F-1 gezeigt werden konnte, stimuliert E2F-1 die *BIM*-Expression direkt (Hershko and Ginsberg, 2004) (siehe 4.3.1). Das deutet darauf hin, dass E2F-1 in unterschiedlichen Zelltypen verschiedene Signalwege verwendet, um Apoptose zu induzieren. In neuronalen TOR7dnF-Zellen sollte die Expression von *BIM* nach Induktion von E2F-1 und/oder dnFOXO überprüft werden. Dazu wurden die Zellen in Medium mit 1% FBS kultiviert und für 15 Stunden 5 nM 4-OHT bzw. für 20 Stunden Doxyzyklin zugegeben. Der gleichzeitigen Behandlung mit

beiden Reagenzien für 15 Stunden ging also eine 5-stündige Gabe von Doxyzyklin voraus. Anschließend wurde RNA aus den Zellen isoliert und cDNA synthetisiert. Die mRNA-Mengen von *CCNE1*, als Positivkontrolle für die E2F-1-Induktion, und *BMI1* wurden durch qRT-PCRs ermittelt (Abbildung 39).

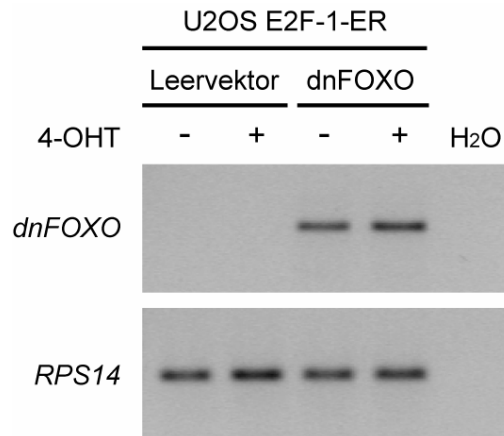


**Abbildung 39: Die Genexpression von *CCNE1* und *BIM* wird nach Aktivierung von E2F-1-ER erhöht, jedoch nicht nach Induktion von dnFOXO.** TOR7dnF-Zellen wurde in Medium mit 1% FBS kultiviert und für 5 Stunden mit Doxyzyklin oder Ethanol behandelt. Dann folgte eine Inkubation mit 5 nM 4-OHT und/oder Doxyzyklin für weitere 15 Stunden. Anschließend wurde die RNA isoliert und cDNA synthetisiert. Mittels qRT-PCRs konnten die ursprünglichen mRNA-Mengen von *CCNE1* und *BIM*, nach Normalisierung auf *RPS14*-mRNA, ermittelt werden.

Die Gabe von Doxyzyklin hat keine Auswirkung auf *BIM* oder *CCNE1* im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (Abbildung 39). Die Aktivierung von E2F-1 durch Zugabe von 4-OHT wird durch die 12,5-fache Erhöhung der *CCNE1*-mRNA belegt. Auch die mRNA-Menge von *BIM* steigt, wie für ein E2F-1-Zielgen erwartet, an. Die Induktion von dnFOXO bei aktiviertem E2F-1 bewirkt keine Änderung der *BIM*-mRNA und zeigte damit, dass FOXOs für die E2F-1-vermittelte Induktion von *BIM* keine Rolle spielen.

Da ein Zelltyp-spezifischer Effekt nicht auszuschließen war, sollte die Wirkung von dnFOXO noch in einer weiteren Zellart untersucht werden. Es war bekannt, dass in U2OS Osteosarkomzellen unter Standardkulturbedingungen FOXOs zumindest teilweise im Kern lokalisiert sind (Nakamura et al., 2000). Aufgrund dessen wurden U2OS-Zellen mit dem Plasmid pBABE *HYGRO EcoR* transfiziert. Dieses Konstrukt kodiert für den ekotropen Rezeptor und besitzt außerdem ein *Hygromycin*-Resistenzgen,

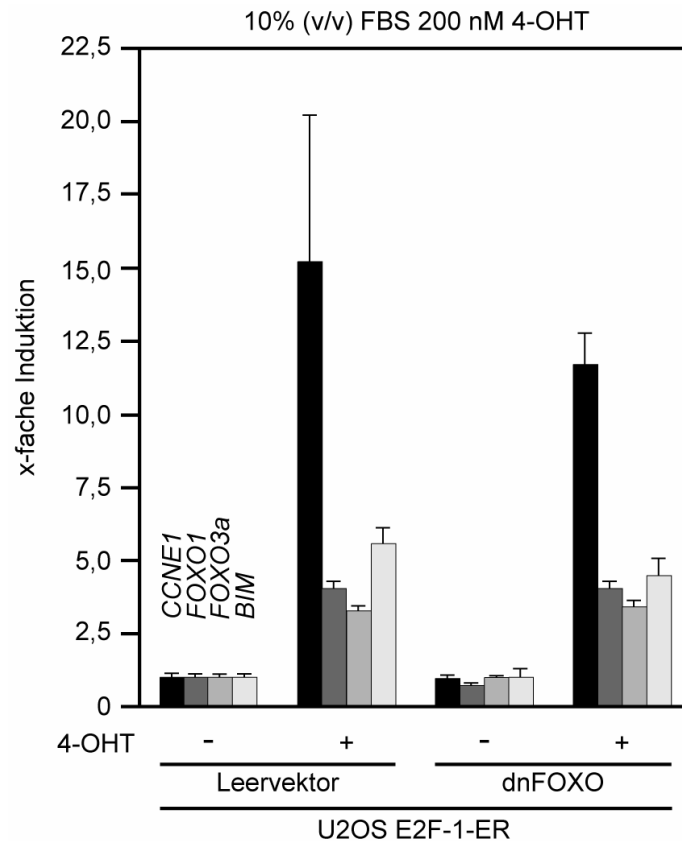
wodurch mit Hygromyzin B selektioniert werden konnte. Nach mehrfacher Infektion mit verschiedenen Retroviren exprimierten alle U2OS-Zellen E2F-1-ER sowie entweder dnFOXO oder einen Leervektor. Diese U2OS-Zellen wurden bei 1% bzw. 10% FBS kultiviert und entweder 5 nM oder 200 nM 4-OHT zugegeben. Die isolierte RNA wurde in cDNA umgeschrieben und zunächst die Expression des *dnFOXO* mittels semiquantitativer PCR überprüft (Abbildung 40).



**Abbildung 40: Nachweis des *dnFOXO*-Gens in U2OS E2F-1-ER *dnFOXO*-Zellen.** U2OS-Zellen wurden zunächst mit pBABE *HYGRO EcoR* transfiziert und mit Hygromyzin B selektioniert. Dann wurden diese U2OS-EH-Zellen mit Viren infiziert, die nach Transfektion von PHX-Zellen mit pWZL *NEO HA-ER-E2F-1* entstanden waren. Auf die Anwesenheit des E2F-1-ER-Gens konnte mit G418 selektioniert werden. Anschließend erfolgte eine Infektion dieser U2OS E2F-1-ER-Zellen mit Viren, die durch Transfektion von PHX-Zellen mit pBABE *PUR0 AFX-DB* oder pBABE *PUR0*-Leervektor hergestellt worden waren. pBABE *PUR0 AFX-DB* enthält die Sequenz für die DNA-Bindungs- (DB) bzw. Forkhead-Domäne von FOXO4 (AFX), die zwischen den FOXO-Mitgliedern der Säugetiere konserviert ist und als dominant-negatives Protein wirkt. Durch die Behandlung mit Puromyzin konnte in diesen Zellen auf Anwesenheit dieser Konstrukte selektioniert werden. Die Zellen wurden dann für 14 Stunden mit 200 nM 4-OHT behandelt, die RNA anschließend isoliert und cDNA synthetisiert. Zur Kontrolle der Sauberkeit wurde eine semiquantitative PCR mit den Primern *dnFOXO* und *HA-Tag* durchgeführt. Die Sequenz der DNA-Bindungsdomäne war mit der HA-Tag-Sequenz verbunden. So konnte durch Nutzung dieser Primer die Anwesenheit der *dnFOXO*-Sequenz nachgewiesen werden. Zur Normalisierung wurde mit diesen cDNAs auch eine PCR mit *RPS14*-Primern durchgeführt.

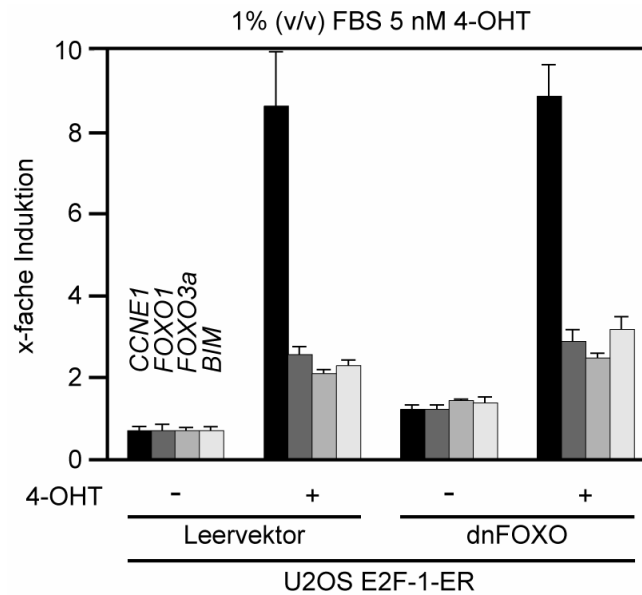
In den Proben der Zellen mit dem Leervektor ist keine Bande für das *dnFOXO* zu erkennen. Die mit *dnFOXO*-infizierten Zellen zeigen dagegen eine deutliche Bande. Damit konnte bestätigt werden, dass die Infektion der *dnFOXO*-Sequenz erfolgreich war und die verschiedenen U2OS-Zelllinien separat kultiviert worden sind. Mittels qRT-PCRs wurden nun die Mengen von *CCNE1*, *FOXO1*, *FOXO3a* und *BIM* mRNA bestimmt. Die Erhöhung der *CCNE1* mRNA-Menge bei Zugabe von 5 nM oder 200 nM 4-OHT diente hier wieder als Kontrolle der Expression von *E2F-1-ER*.





**Abbildung 41: Genexpressionsänderungen von *CCNE1*, *FOXO1*, *FOXO3a* und *BIM* nach Induktion von E2F-1-ER mit 200 nM 4-OHT in U2OS-Zellen mit oder ohne dnFOXO.** Die unter Abbildung 40 beschriebenen, verschiedenen Zelllinien wurden in Medium mit 10% FBS kultiviert und für 14 Stunden mit 200 nM 4-OHT behandelt. Dann wurde die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels qRT-PCRs die ursprünglich, vorhandenen mRNA-Mengen von *CCNE1*, *FOXO1*, *FOXO3a* und *BIM* ermittelt. Die mRNA-Menge von RPS14 wurde ebenfalls bestimmt und zur Normalisierung verwendet.

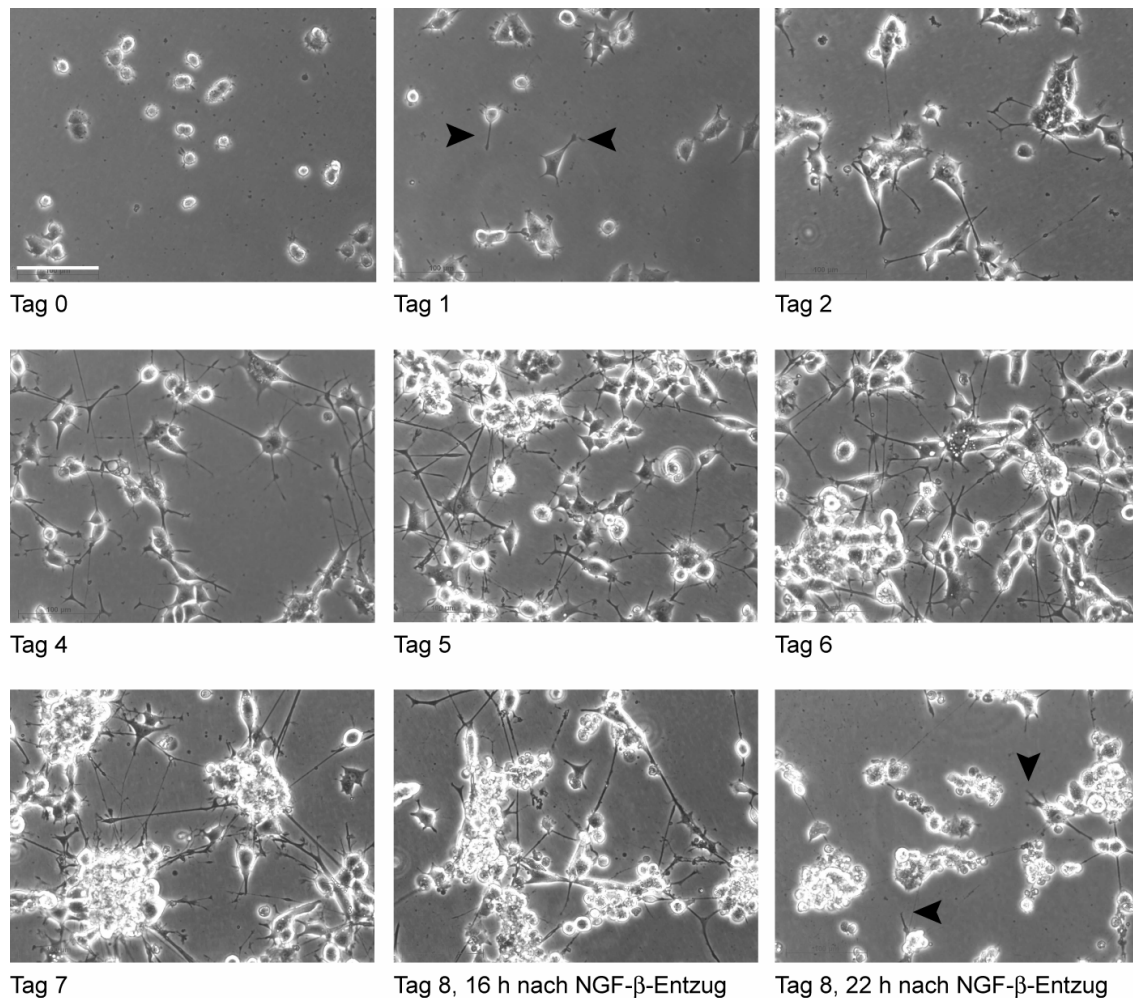
In beiden Diagrammen ist deutlich die Induktion aller vier Gene nach Aktivierung von E2F-1-ER erkennbar (Abbildung 41 und Abbildung 42). Die absoluten Werte sind wie erwartet bei 10% FBS und 200 nM 4-OHT höher als bei 1% FBS und 5 nM 4-OHT. Übereinstimmend kann festgestellt werden, dass die Anwesenheit von dnFOXO in diesen Zellen keinen Einfluss auf die mRNA-Menge von *BIM* hat. Dies ist auch nicht durch veränderte Mengen von *FOXO1* oder *FOXO3a* zu erklären.



**Abbildung 42: Änderungen der Genexpressionen von *CCNE1*, *FOXO1*, *FOXO3a* und *BIM* nach Induktion von E2F-1-ER mit 5 nM 4-OHT in U2OS-Zellen mit oder ohne dnFOXO.** Die unter Abbildung 40 beschriebenen, verschiedenen Zelllinien wurden in Medium mit 1% FBS kultiviert und für 14 Stunden mit 5 nM 4-OHT behandelt. Dann erfolgte die Aufarbeitung und Analyse wie unter Abbildung 41 beschrieben.

Da spezifische genetische Veränderungen in bestimmten neuronalen Tumoren, Glioblastomen, eine eventuelle Verbindung der E2F-1-induzierten Apoptose und den FOXOs dabei nahe legen (siehe 1.5.6), sollte dies in einem Modell der neuronalen Apoptose untersucht werden. Dafür wurden die neuronalen Pheochromozytomzellen der Ratte, PC12, verwendet. Diese Zellen sind ursprünglich nicht differenziert und zeigen eine typische, polygonale Morphologie. Nach Zugabe von NGF- $\beta$  (Nerve Growth Factor- $\beta$ , Nervenwachstumsfaktor- $\beta$ ) differenzieren sie und bilden Neuriten-artige Fortsätze (Pittman et al., 1993). Sie werden jedoch von NGF abhängig und nach NGF- $\beta$ -Entzug wird Apoptose induziert (Pittman et al., 1993). Dabei erfolgt eine Aktivierung von E2F-1 und somit eine mögliche Induktion von E2F-1-Zielgenen (Liu and Greene, 2001). In diesem Modell sollte die Rolle der FOXOs in der E2F-1-vermittelten, neuronalen Apoptose untersucht werden. Dazu wurden PC12-Zellen für 7 Tage mit NGF- $\beta$  behandelt. Ausgehend von einer normalen, polygonalen Morphologie differenzierten die Zellen schrittweise. Nach bereits einem Tag waren die ersten Fortsätze erkennbar, die sich nach 5 Tagen zu einem Netz entwickelt hatten (Abbildung 43). Außerdem bilden die PC12-Zellen eine Art Pseudoganglien, wie am Tag 7 gut zu erkennen ist. Nach 7 Tagen wurden die Zellen gewaschen und Antikörper gegen NGF- $\beta$  wurden zum Neutralisieren verbliebener Moleküle hinzugegeben. Sowohl vor dem

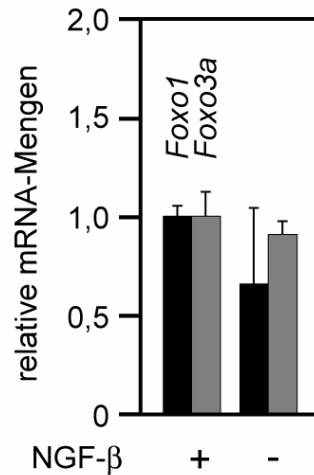
Waschen am Tag 7 als auch 14 Stunden nach NGF- $\beta$ -Entzug wurden Proben entnommen, RNA isoliert, cDNA synthetisiert und die mRNA-Mengen mittels RT-PCRs quantifiziert. Die mRNA-Mengen von *FOXO1* und *FOXO3a* zeigten jedoch keine Änderung nach NGF- $\beta$ -Entzug (Abbildung 44).



**Abbildung 43: Schrittweise Differenzierung der PC12-Zellen bei NGF- $\beta$ -Behandlung und morphologische Anzeichen neuronaler Apoptose nach NGF- $\beta$ -Entzug.** PC12-Zellen wurden rund 24 Stunden nach dem Ausplattieren gewaschen und mit Medium und nur 1% PS versehen. Dann wurde 100 ng/ml NGF- $\beta$  hinzugegeben und die schrittweise Differenzierung dokumentiert. Nach 2,5 und 5 Tagen erfolgte ein Mediumwechsel und erneute NGF- $\beta$ -Zugabe. Nach 7 Tagen wurden die Zellen gewaschen, Medium mit 1% PS zugegeben und anti-NGF- $\beta$ -Antikörper hinzupipettiert. Die schwarzen Pfeile deuten auf sich bildende bzw. sich zurückbildende Fortsätze der Zellen. Der weiße Balken entspricht 100  $\mu$ m.

Morphologisch waren kleine, abgerundete Zellen und eine Abnahme der Zellzahl ebenso zu erkennen wie die Rückentwicklung der Fortsätze und die Auflösung der Netz-artigen Strukturen (Abbildung 43 und Daten nicht gezeigt). Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass die Zellen apoptotisch wurden. Auch erfolgte eine Ablösung der Zellen von den Schalen, was ein weiteres Indiz für Apoptose ist. Der Morphologie

nach zu urteilen, waren nach ca. 72 Stunden fast alle Zellen gestorben. Aufgrund dessen wurde geschlussfolgert, dass die Induktion der *FOXOs* auf transkriptioneller Ebene durch E2F-1 für diese Art der neuronalen Apoptose nicht nötig ist.



**Abbildung 44: Die relativen mRNA-Mengen von *Foxo1* und *Foxo3a* veränderten sich nach NGF- $\beta$ -Entzug nicht.** Wie bei Abbildung 43 bereits beschrieben, wurden PC12-Zellen mit NGF- $\beta$  behandelt. Am Tag 7 wurden einige Zellen aus dem Versuch genommen, pelletiert und schockgefroren. Dies wurde ebenfalls mit Zellen 14 Stunden nach NGF- $\beta$ -Entzug gemacht. Dann wurde gleichzeitig die RNA isoliert und cDNA synthetisiert. Mittels qRT-PCRs wurden die ursprünglich vorhandenen, relativen mRNA-Mengen von *Foxo1* und *Foxo3a* ermittelt. Die Normalisierung erfolgte durch Abgleich auf die mRNA-Mengen von *Rps16*.

## 5 DISKUSSION

### 5.1 Die Funktion der Regulation von BMI1 durch E2F-1

Ein erster cDNA-Microarray zur Identifizierung von E2F-1-Zielgenen wurde von Christoph Kramps durchgeführt. Von den erhaltenen Resultaten wurde *BMII* weiter untersucht, da bereits bekannt war, dass E2F-1 zwei Gene der Polycomb-Gruppe reguliert (Bracken et al., 2003; Muller et al., 2001). Diese Gene, *EED* und *EZH2*, kodieren Proteine des PRC2 und werden durch E2F-1 induziert. Durch verschiedene Experimente im Vorfeld dieser Doktorarbeit konnte gezeigt werden, dass E2F-1 in Neuroblastomzellen direkt an den *BMII*-Promotor bindet und die Expression erhöht.

#### 5.1.1 Die Auswirkungen der Stimulation von E2F-1-ER und physiologischer E2F-1-Aktivität

Zur Bestätigung und zur Identifizierung weiterer potentieller E2F-1-Zielgene wurde ein zweiter cDNA-Microarray durchgeführt (siehe 4.2.1 und Tabelle 8). Außerdem wurde der Einfluss der 4-OHT-Gabe in einem Kontrollexperiment untersucht. Dazu wurde ein cDNA-Microarray mit parental SK-N-SH-EP-Zellen, die kein E2F-1-ER-Fusionsprotein besaßen, durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von Zellen mit 4-OHT allein nicht die Genexpression der möglichen E2F-1-Zielgene verändert (Abbildung 10, Abbildung 11). Somit stellten die erhaltenen Resultate potentielle Zielgene von E2F-1 dar. Von den Genen mit einer funktionellen Annotierung wurden 79 bereits als E2F-1-Zielgene in U2OS-Zellen beschrieben (Muller et al., 2001). Dies unterstreicht die Funktionstüchtigkeit des durchgeführten cDNA-Microarrays. Darüber hinaus fiel auf, dass viele der identifizierten Gene eine Rolle in der transkriptionellen Regulation einer Zelle besitzen. Das lässt vermuten, dass nach der Primärantwort einer Zelle auf eine E2F-1-Aktivierung eine komplexe Sekundärantwort durch die Involvierung vieler Signalwege folgt. Während mit *EED* und *EZH2* einige Komponenten des PRC2 durch E2F-1 aktiviert werden und auch dem hier beschriebenen cDNA-Microarray auftauchten, ist *BMII* das einzige E2F-1-Zielgen, dessen Produkt Teil des PRC1 ist. Dies führt zu der Frage, welche Relevanz die Aktivierung

einer einzelnen Komplexkomponente durch E2F-1 hat, während andere Komponenten nicht beeinflusst werden. Vorstellbar wäre zum Beispiel, dass in Folge der Aktivierung von *BMII* durch E2F-1 der BMI1-Anteil im PRC1 erhöht wird und sich damit die Zielgenspezifität verändert (Jacobs and van Lohuizen, 2002) (siehe 5.1.8).

Um einige ausgewählte potentielle Zielgene zu bestätigen, wurden qRT-PCRs durchgeführt. Alle untersuchten Gene zeigten eine entsprechende Expressionserhöhung oder -erniedrigung nach E2F-1-Aktivierung, jedoch keine Änderung in den parental Zellen ohne das E2F-1-ER-Fusionsprotein (Abbildung 12). Dies unterstreicht erneut die Schlussfolgerung, dass in diesem induzierbaren System, die identifizierten Gene potentielle Ziele von E2F-1 sind und die induzierende Substanz an sich keine Veränderung ihrer Expression bewirkt.

In den cDNA-Microarray-Experimenten konnte nicht geklärt werden, ob eine direkte Regulation durch E2F-1 zugrunde lag oder ob E2F-1 lediglich Aktivatoren und Repressoren induzierte, die dann auf die eigentlichen Gene wirkten. Dies könnte durch eine Verringerung der Einwirkzeit von 4-OHT oder durch gleichzeitige Gabe des Translationsinhibitors Zykloheximid untersucht werden. Für *BMII* und die *FOXOs* konnte in Einzelexperimenten von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe bestätigt werden, dass sie direkte Zielgene von E2F-1 sind (persönliche Mitteilung von Christoph Kramps und Christine Gessner). Um dies für die Vielzahl der identifizierten potentiellen Zielgene zu untersuchen, würde sich jedoch wieder ein cDNA-Microarray anbieten.

Zur Identifizierung potentieller E2F-1-Zielgene wurde hier mit übermäßig hohen Mengen an aktivem E2F-1 gearbeitet. Dadurch kann es zur Induktion von Genen kommen, die bei physiologischer E2F-1-Aktivität keine Änderung ihrer Genexpression zeigen. Auch bei Deregulationen des E2F/Pocketprotein-Signalweges in Tumoren sind die aktiven E2F-1-Mengen in den Zellen geringer als bei Aktivierung des gesamten, ektopisch exprimierten *E2F-1-ER* mit 200 nM 4-OHT. Um auszuschließen, dass *BMII* und die *FOXOs* nur Zielgene von übermäßig hohen Mengen aktivierten E2F-1 sind, wurde ihre Genexpressionänderung bei physiologischer E2F-1-Aktivität analysiert. Dazu wurde in Vorversuchen eine geeignete Konzentration von 4-OHT ermittelt, bei der eine physiologische E2F-1-Aktivität induziert werden kann (Abbildung 37).

Sowohl *FOXO1* und *FOXO3a* als auch *BMII* zeigten eine Erhöhung ihrer mRNA nach Induktion von physiologischer E2F-1-Aktivität (Abbildung 38). Somit sind die Induktionen von den *FOXOs* und *BMII* durch E2F-1 keine Artefakte einer übermäßigen

Menge von aktivem E2F-1, sondern vielmehr eine Regulation, die unter physiologischen Bedingungen auch stattfinden kann. Während den verschiedenen Programmen einer Zelle, wie zum Beispiel Entwicklung, Differenzierung oder Apoptose, können Veränderungen der Signaltransduktion auftreten, die auch zu einer Deregulation des E2F/Pocketprotein-Signalweges führen können. Die dabei veränderte E2F-Aktivität hat direkte Auswirkungen auf die Expression von *BMII* und den *FOXOs*, deren Genprodukte als Transkriptionsfaktoren wiederum etliche weitere Zielgene regulieren. So kann durch die Deregulation von E2F letztendlich ein Einfluss auf viele Gene und damit auf eine Vielzahl von verschiedenen zellulären Programmen erfolgen. Da schon viele E2F-1-Zielgene bekannt sind, ist von besonderem Interesse, welche spezielle, funktionelle Relevanz die Regulation von *BMII* und den *FOXOs* durch physiologische E2F-1-Aktivität hat. Ein Ansatz zu dieser Aufklärung wäre die Untersuchung eines zellulären Programms, bei dem eine physiologische Erhöhung der E2F-1-Aktivität beschrieben wurde. Nur ein Beispiel ist die durch Entzug von Wachstumsfaktoren eintretende neuronale Apoptose, in deren Verlauf E2F-1 dereguliert wird.

### **5.1.2 Die Wirkung der Induktion von BMI1 durch E2F-1 auf seine Proteinmenge und in verschiedenen Organismen**

Eine Erhöhung der Genexpression resultiert meistens in einer Anreicherung des kodierten Proteins. Jedoch gibt es auch Fälle, bei denen die mRNA-Stabilität oder die Translationsrate verringert sind, so dass keine Änderung der Proteinmenge erfolgt. Dies geschieht meistens, wenn die entstehenden Proteine durch eine ihrer Funktionen toxisch für die Zellen sind. Hier konnte gezeigt werden, dass eine Steigerung der Genexpression von *BMII* auch eine Erhöhung der BMI1-Proteinmenge zur Folge hat (Abbildung 13). Somit scheinen diese Tumorzellen gesteigerte BMI1-Mengen zu tolerieren. Ursache hierfür sind u.a. die anti-apoptotische Wirkung von BMI1 und seine Inhibierung des Zellzyklusinhibitors p16<sup>INK4A</sup>. So resultiert der Verlust von BMI1 in der Apoptose von Tumorzelllinien (Liu et al., 2006a). Es konnte nicht geklärt werden, ob BMI1 posttranslationalen Veränderungen unterliegt, die seine Aktivität beeinflussen. Bisher ist nur die Phosphorylierung von BMI1 beschrieben, die einen Einfluss auf die Chromatinassoziation hat, aber die Stabilität von BMI1 nicht verändert (Voncken et al., 1999; Voncken et al., 2004).

Regulationen, die einen Teil eines essentiellen Signalweges in verschiedenen Geweben oder sogar Organismen darstellen, sind konserviert. Da für den cDNA-Microarray als auch für die Validierungsexperimente humane Neuroblastomzellen genutzt wurden, war zunächst unklar, ob E2F-1 *BMI1* auch in Zelllinien aus anderen Geweben oder Organismen induziert. In dieser Doktorarbeit konnte gezeigt werden, dass aktiviertes E2F-1 auch eine Erhöhung von BMI1 in immortalisierten Mausfibroblasten NIH3T3 bewirkt (Abbildung 14). Diese Induktion wurde von der Mitarbeiterin Christine Gessner in Rat1 Rattenfibroblasten bestätigt und wird unterstützt durch ein positives Ergebnis für U2OS humane Osteosarkomzellen (Daten nicht gezeigt). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Regulation von BMI1 durch E2F-1 in mehreren Organismen vorkommt. Interessant wäre die Untersuchung der Regulation von BMI1 durch E2F-1 in weiteren Organismen, die evolutionär weiter vom Menschen entfernt sind. Dadurch könnte der Zeitpunkt in der Evolution bestimmt werden, an dem diese Regulation für Organismen relevant und deshalb konserviert wurde. So ist bisher unklar, ob diese Regulation in zum Beispiel *Drosophila melanogaster*, bei der die Polycomb-Proteine bewiesenermaßen eine große Rolle spielen, Bestand hat.

### **5.1.3 E2F-1-induziertes BMI1 ist im Nukleus lokalisiert und an Chromatin assoziiert**

Die Wirkung von Transkriptionsfaktoren kann zum Beispiel durch Export aus dem Kern oder Verhinderung der Chromatinassoziation inhibiert werden. Da das durch E2F-1-Induktion zusätzlich gebildete BMI1 im Zellkern lokalisiert und an Chromatin gebunden ist, kann es an der Regulation der Genexpression mitwirken (Abbildung 15, Abbildung 16). Es ist ferner bekannt, dass die Phosphorylierung von BMI1 Einfluss auf seine Chromatinassoziation hat und Zellzyklus-abhängig ist (Voncken et al., 1999). Da, wie das endogene Protein, auch das E2F-1-induzierte BMI1 Chromatin-gebunden ist, scheint die Phosphorylierung sich ebenfalls nicht zu unterscheiden. Die verschiedenen Proben wurden jeweils von asynchron proliferierenden Zellen genommen, so dass die Verteilung der Zellen im Zellzyklus stets ungefähr gleich gewesen sein müsste. Deshalb scheint der Phosphorylierungsstatus von durch E2F-1-Induktion zusätzlich gebildetem BMI1 keinen Einfluss auf seine Chromatinassoziation und damit Funktionstüchtigkeit zu haben.



In Abbildung 15 und Abbildung 16 ist außerdem zu erkennen, dass zwei Banden durch den anti-BMI1-Antikörper detektiert werden. Dies kann durch einen unterschiedlichen Phosphorylierungsgrad erklärt werden. In Abbildung 15 scheint die Bande von BMI1 geringen Molekulargewichtes nach Behandlung mit 4-OHT zuzunehmen. Dies könnte entweder ein Blotartefakt oder eine Veränderung des Phosphorylierungsgrads darstellen. Da kein Antikörper gegen phosphoryliertes BMI1 zur Verfügung stand und die Phosphorylierung bisher nicht detaillierter beschrieben ist, kann darüber keine Aussage getroffen werden. Dass bei Behandlung von 1A3-Zellen mit Ethanol in Abbildung 16 scheinbar nur eine Bande zu sehen ist, beruht auf der bereits erwähnten begrenzten Auflösung der Abbildung. Außerdem kam es vermutlich durch Stauchung der Laufbahn zu einer vergrößerten Bandenhöhe, wodurch die zwei Banden nur noch als eine erscheinen.

Nicht geklärt werden konnte, ob die Erhöhung der BMI1-Menge durch E2F-1 auch eine verstärkte Repression seiner Zielgene nach sich zieht, weil die bekannten BMI1-Zielgene, *INK4A* und *ARF*, auch direkt von E2F-1 reguliert werden. Die induzierende Wirkung von E2F-1 hätte eventuell den verstärkten, reprimierenden Effekt von BMI1 überdeckt. Aus diesem Grund wurde versucht, ein „Loss-of-function“-System für BMI1 zu etablieren, um Zielgene zu identifizieren, die unabhängig von E2F-1 nur durch BMI1 reguliert werden können.

#### **5.1.4 Die Ursachen der Probleme bei der Etablierung eines „Loss-of-function“-Systems für BMI1**

Zunächst wurde ein cDNA-Microarray mit Zellen durchgeführt, in denen das vermeintlich dominant-negativ wirkende Allel *BMI1-ARF* induziert und gleichzeitig E2F-1-ER aktiviert werden kann. Von der BMI1-Deletionsmutante war bekannt, dass sie mit Wildtyp-BMI1 dimerisieren und über die Inhibierung von diesem die Induktion von p16<sup>INK4A</sup> bewirken kann (Satijn and Otte, 1999; Itahana et al., 2003). Von den Resultaten des cDNA-Microarrays wurden drei Gene, *SOCS-1*, *OS-9* und *CS*, herausgesucht. Die Expression dieser potentiellen BMI1-Zielgene war bei Induktion von BMI1- $\Delta$ RF in Kombination mit aktiviertem E2F-1-ER im Vergleich zu der bei nur aktiviertem E2F-1-ER im cDNA-Microarray erhöht (Tabelle 4). Nähere Unter-

suchungen mit qRT-PCRs konnten diese Ergebnisse jedoch nicht bestätigen (Abbildung 18). Zwar wurde die Expression von *OS-9* und *CS* bei aktiviertem E2F-1 und induziertem BMI1- $\Delta$ RF gesteigert, doch war der Umfang der Erhöhung mit ca. 1,5fach zu gering. Die Arbeit mit dominant-negativen Allelen ist schwierig, da u. a. die Konzentration im Vergleich zum Wildtyp-Protein von Bedeutung ist. So wird zum Beispiel für p53 diskutiert, dass bei vergleichbaren Mengen des Wildtyp- und des dominant-negativen Proteins, das dnp53 die Funktionen des p53 wt nicht reprimieren kann (Blagosklonny, 2000). Da BMI1- $\Delta$ RF nur in vergleichbaren Mengen wie BMI1 wt gebildet wurde, könnte dies ein Grund für die schlechte Reproduzierbarkeit der cDNA-Microarray-Ergebnisse gewesen sein. Die Mengen von BMI1- $\Delta$ RF hätten für eine reproduzierbare Repression des Wildtyp-Proteins wesentlich höher sein müssen. Die Wirkung vom Ringfinger-deletiertem BMI1 scheint somit nicht in allen Fällen dominant-negativ gewesen zu sein.

Die RNA-Interferenz bietet, durch die Reduktion der Menge eines endogenen Proteins, eine deutlich gezieltere Variante der Hemmung eines Proteins. Aufgrund dessen entwickelt sich die RNA-Interferenz immer mehr zur Methode der Wahl als „Loss-of-function“-System, wenn allein die Zahl der Veröffentlichungen betrachtet wird (für „RNA interference“: 72 Artikel im Jahr 2000 im Vergleich zu 1314 für 2007). Es wurde sowohl an der Etablierung von induzierbaren als auch konstitutiv-exprimierenden *shBMI1*-Klonen gearbeitet (Kornelius Kerl sowie Ergebnisse meiner Doktorarbeit). Beide Systeme konnten nicht zur Identifizierung von BMI1-Zielgenen bzw. für weiterführende Experimente genutzt werden, da der Umfang der Reduktion der BMI1-Proteinmenge nur etwa dreifach und nicht reproduzierbar war (Abbildung 19, Abbildung 21). Es wurde zwar ein *shBMI1*-Klon (Klon #19) identifiziert, der eine gegen *BMI1* gerichtete *shRNA* konstitutiv exprimierte und zunächst eine deutliche Verringerung der Proteinmenge auf unter 30% zeigte (Abbildung 21). Jedoch war die Reduktion von BMI1 bei Analyse eines zweiten Lysates nach einigen Passagen der Zellen nur noch auf etwa 33% (Abbildung 22). Das könnte eventuell die Folge eines Wachstumsnachteils der Zellen mit verringertem BMI1-Level sein. Dabei hätten diejenigen Zellen einen Vorteil, die die *shRNA* gegen BMI1 nicht oder fehlerhaft integriert, inaktiviert oder wieder ausgeschleust hätten. Sie würden weiter proliferieren, während Zellen mit effizienter Reduktion von BMI1 durch verringertes Wachstum und Teilung einen immer kleineren Anteil ausmachen würden. Dadurch käme es zu einer

negativen Selektion der *shBMI1*-Zellen, was sich in einer Abnahme des Effektes der BMI1-Reduktion bemerkbar machen würde. Diese Vermutung wurde unterstützt durch das Ergebnis eines Koloniebildungsexperimentes. Dabei war eine verringerte Proliferation bzw. Anzahl von Kolonien bei BMI1-Reduktion im Vergleich zur Kontrolle zu erkennen (Daten nicht gezeigt). Inzwischen zeigen auch Daten anderer Arbeitsgruppen, dass BMI1 für die Proliferation von verschiedenen Tumorzelllinien notwendig ist und eine Verringerung der BMI1-Menge dementsprechend negativ selektioniert wird (Cui et al., 2006; Liu et al., 2006a; Kang et al., 2007). So bewirkte auch da die Langzeitkultivierung von Neuroblastomzellen mit *shRNA* gegen *BMI1* eine Selektion für die Subpopulation von Zellen, die normale Mengen an BMI1 enthielten (Cui et al., 2006). Daraus wurde geschlussfolgert, dass BMI1 für die Aufrechterhaltung des proliferativen Potentials dieser Zellen notwendig ist (Cui et al., 2006). Kürzlich konnten zudem in verschiedenen Neuroblastomzelllinien im Vergleich zu Zelllinien aus Glioblastomen erhöhte BMI1-Proteinmengen detektiert werden (Cui et al., 2007). In Soft-Agar-Experimenten bildeten sich nach Verringerung der BMI1-Mengen mittels RNA-Interferenz deutlich weniger und kleinere Kolonien als bei der Kontrolle (Cui et al., 2007). Daraus wurde geschlossen, dass die Reduktion von BMI1 die klonogene Aktivität von Neuroblastomzellen inhibiert. Noch deutlicher wurde diese Funktion von BMI1 bei Injektion von Neuroblastomzellen mit verringertem BMI1-Level in immundefiziente Mäuse (Cui et al., 2007). Im Gegenteil zu mit Kontrollzellen infizierten Tieren bildeten sich in diesen Mäusen entweder keine oder wesentlich kleinere Tumore. Diese Ergebnisse gehen mit den von mir beobachteten Effekten bei Reduktion von BMI1 einher. Da BMI1 für das proliferative Potential von Neuroblastomzellen notwendig ist, wirkt eine Verringerung der BMI1-Level negativ auf das Wachstum und die Teilung der Zellen. Dies erklärt die Probleme bei der Etablierung von konstitutiv-exprimierenden *shBMI1*-Klonen.

Beim induzierbaren Zellklon siK5 sollte dieser Effekt jedoch nicht die Ursache für die geringe Effizienz und schlechte Reproduzierbarkeit der Reduktion von BMI1 sein. Eine Ausnahme würde eine sogenannte Undichtheit des Systems darstellen. Dabei würde es ohne Induktion trotzdem zu einer geringen Expression der *shRNA* gegen *BMI1* kommen. Damit könnte die negative Selektion wieder an Bedeutung gewinnen. Es ist jedoch wahrscheinlicher, dass eine zu geringe Kopienzahl der integrierten *shBMI1*-Sequenz ein Grund für die lediglich moderate Reduktion der BMI1-Proteinmenge in dem induzierbaren Zellklon siK5 war.

### 5.1.5 *BM11* wird nicht beim Wiedereintritt in den Zellzyklus induziert

In Mitogen-stimulierten Zellen besteht eine Hauptfunktion von E2F-1 in der Induktion von Genen, deren Produkte essentiell für den Übergang zur S-Phase des Zellzyklus sind. Die Expression dieser E2F-1-Zielgene, wie zum Beispiel *CCNE1*, ist aufgrund dessen während des Zellzyklus reguliert. In der G0- und zu Beginn der G1-Phase befinden sich Repressorkomplexe von p107 und p130 mit E2F-4 oder E2F-5 auf den meisten Promotoren von E2F-Zielgenen (Takahashi et al., 2000; Wells et al., 2000; Rayman et al., 2002). E2F-1/2/3 werden währenddessen von pRB gebunden und so an der Transaktivierung gehindert. In der späten G1-Phase werden die Pocketproteine hyperphosphoryliert und dissoziieren von den E2Fs, was zur Translokalisierung von E2F-4 und E2F-5 in das Zytoplasma führt. An die Promotoren der E2F-Zielgene binden nun E2F-1/2/3 und es erfolgt eine Aktivierung. Die erhöhte Genexpression führt zur rapiden Steigerung der Menge von zum Beispiel Cyclin E, welches eine essentielle Funktion beim Übergang von der G1- zur S-Phase des Zellzyklus innehat. Diese vereinfachte, bisher allgemein anerkannte Darstellung könnte die Ursache der Zellzyklusregulation der meisten E2F-1-Zielgene sein. Damit wäre auch der Zellzyklusarrest nach Verlust von E2F-1, E2F-2 und E2F-3 und damit die fehlende oder verringerte E2F-Zielgenexpression erklärbar (Wu et al., 2001).

Aufgrund von verschiedenen Untersuchungen wurde nun jedoch ein verändertes Modell der Funktionsweise der aktivierenden E2Fs aufgestellt (Rowland and Bernards, 2006). Dabei verhindern die aktivierenden E2Fs in asynchron proliferierenden Zellen lediglich die Hemmung durch reprimierende E2Fs. Nach der Deletion von E2F-1, E2F-2 und E2F-3 können die verbliebenen reprimierenden E2Fs dann die Zielgenpromotoren binden und eine Repression ausüben. Dies resultiert ebenfalls in dem beobachteten Zellzyklusarrest in MEFs, die defizient für *E2f-1*, *E2f-2* und *E2f-3* sind (Wu et al., 2001). Die aktivierenden E2Fs und ihre Zielgenaktivierung wären dann nur noch für den Übergang von arretierten Zellen aus der G0- in die S-Phase essentiell. Jedoch wird die Zellzyklusregulation eines E2F-Zielgens stets untersucht, indem die Genexpressionsänderung nach Wiedereintritt der Zellen aus der G0-Phase in den Zellzyklus beobachtet wird. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass sich die Expression vieler E2F-Zielgene in asynchron proliferierenden Zellen nicht ändert. Lediglich beim Wiedereintritt ist die erhöhte Expression dieser Gene notwendig, damit die Zellen wieder beginnen zu proliferieren. Trotzdem werden diese E2F-Zielgene noch als

Zellzyklus-reguliert bezeichnet, da ihre Expression beim Wiedereintritt in den Zellzyklus von E2F-1 erhöht wird. In den vergangenen Jahren wurden immer mehr E2F-Zielgene identifiziert, die nicht diese Regulation zeigen und andere E2F-Funktionen vermitteln (Iwanaga et al., 2006; Balciunaite et al., 2005; Komori et al., 2005). Zum Beispiel hemmt E2F-3b die Expression von *ARF* in MEFs, während E2F-1 und E2F-3a aktivierend auf den *ARF*-Promotor wirken (Aslanian et al., 2004). Eine Erhöhung der *ARF*-Expression beim Wiedereintritt der Zellen in den Zellzyklus wäre aufgrund der Funktion von p14<sup>ARF</sup> als Zellzyklusinhibitor kontraproduktiv. *ARF* stellt ein E2F-1-Zielgen dar, das die Induktion der Apoptose vermittelt und keine Rolle für die proliferative Funktion von E2F-1 spielt. Daraus wird deutlich, dass die Frage nach der Zellzyklusregulation von E2F-1-Zielgenen mit der Rolle in einem E2F-1-Programm eng verknüpft ist.

Interessanterweise binden E2F-4/p130-Komplexe den *BMII*-Promotor in arretierten T98G- und U2OS-Zellen *in vivo* (Cam et al., 2004). Die Zellen wurden durch Serumentzug in den Arrest getrieben (Quieszenz), durch Kontaktinhibition arretiert oder p16<sup>INK4A</sup> wurde überexprimiert. Dieses Ergebnis deutet auf eine Repression der *BMII*-Genexpression bei Wachstumsarrest hin und würde vermuten lassen, dass *BMII* nach Wiedereintritt in den Zellzyklus induziert wird. In einem ähnlichen Versuch wurde jedoch gezeigt, dass E2F-4 und p130 bzw. p107 den *BMII*-Promotor auch in Zellen, die sich im Zellzyklus befinden, binden (Balciunaite et al., 2005). Dies lässt stattdessen eine generelle Repression des *BMII*-Promotors durch p130 bzw. p107 in Verbindung mit E2F-4 vermuten. In dieser Doktorarbeit wurde die *BMII*-Expression in primären MEFs und T98G-Zellen während des Wachstumsarrestes durch Serumentzug in G0 und beim Wiedereintritt in den Zellzyklus verglichen. Die mRNA-Mengen von *BMII* blieben über die gesamte untersuchte Zeitspanne weitestgehend unverändert, während für die bekannten Zellzyklus-regulierten E2F-1-Zielgene *CCNE1* und *CCNA2* eine Induktion deutlich erkennbar war (Abbildung 23, Abbildung 24). Somit scheint *BMII* nicht zu den E2F-1-Zielgenen zu gehören, die während des Wiedereintritts in den Zellzyklus reguliert werden. Zur weiteren Untersuchung dieses Aspekts der *BMII*-Regulation wurde *INK4A* in IMR-32 überexprimiert. Auch hier präsentierten *CCNE1* und *CCNA2* sich als typische Zielgene von E2F-1 mit einer Reduktion der Genexpression (Abbildung 25). Die *BMII*-Expression veränderte sich hingegen nicht, womit seine Zellzyklus-unabhängige Regulation unterstrichen wird. *BMII* gehört damit nicht zu den E2F-1-Zielgenen, die zur Wiederaufnahme der Proliferation der Zellen durch E2F-1

induziert werden. Jedoch gibt es eine Reihe von anderen E2F-1-Funktionen, in denen *BMII* von Bedeutung sein könnte (siehe 5.3). Von Interesse dafür wären auch weitere Untersuchungen zur Besetzung und Regulation des *BMII*-Promotors, um zum Beispiel folgende Fragen zu beantworten:

1. Verändert sich die Besetzung des *BMII*-Promotors mit E2Fs und Pocketproteinen in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus von asynchron proliferierenden Zellen?
2. Unter welchen Bedingungen aktiviert E2F-1 den *BMII*-Promotor?
3. Wann erfolgt die Repression vom *BMII*-Promotor durch E2F-4/p130-Komplexe?

Mit der Beantwortung dieser Fragen würde die Aufklärung der biologischen Signifikanz der *BMII*-Regulation durch E2F-1 näher rücken. Außerdem würde dies zum Verständnis der Funktionen von E2F-1-Zielgenen, die nicht Zellzyklus-reguliert sind, beitragen.

#### **5.1.6 Die Rolle von BMI1 in Tumoren und speziell in primären Neuroblastomen**

Durch retrovirale Insertionsmutagenese wurde *Bmi1* als Onkogen entdeckt, dass in Verbindung mit der Überexpression von *c-Myc* zur beschleunigten Entstehung von B-Zell-Lymphomen führte (Alkema et al., 1997; van Lohuizen et al., 1991; Haupt et al., 1991). Durch die Repression von *ARF* inhibiert Bmi1 die *c-Myc*-induzierte Apoptose und das Überleben *c-Myc*-deregulierter Zellen bzw. die Tumorentstehung wird somit möglich (Jacobs et al., 1999b). Doch die Repression des *INK4A/ARF*-Lokus durch BMI1 und die dadurch verringerten Mengen der Tumorsuppressoren p16<sup>INK4A</sup> und p14<sup>ARF</sup> haben auch generell eine positive Wirkung auf die Proliferation von Tumorzellen. Inzwischen gibt es etliche Veröffentlichungen, die eine *BMII*-Überexpression oder -Anreicherung in verschiedensten Tumorarten, wie zum Beispiel Lymphomen, Leukämien und Prostatakrebs belegen (Alkema et al., 1997; Bea et al., 2001; Leung et al., 2004; Dik et al., 2005; Tateishi et al., 2006; van Leenders et al., 2006; Sanchez-Beato et al., 2006; Marker, 2007; Prince et al., 2007; van Galen et al., 2007). Zusätzlich spielt BMI1 in Tumorstammzellen eine Rolle. Aus diesen Zellen kann sich in Transplantationsexperimenten ein neuer Tumor bilden (Bonnet and Dick, 1997). Es ist bereits bekannt, dass BMI1 für das proliferative Potential von normalen und leukämischen

Stammzellen notwendig ist (Lessard and Sauvageau, 2003). Deshalb wird vermutet, dass BMI1 generell für die Proliferation von Tumorstammzellen essentiell sein könnte. Neuroblastome entstehen aus Stammzellen der Neuralleiste und werden deshalb auch als Stammzelltumore bezeichnet (Ishikawa, 1977). Während die Progression dieser Tumorart gut untersucht war, gab es bisher keine Hinweise zur Initiation von Neuroblastomen. Dies war ein weiterer Grund eine mögliche Rolle von BMI1 bei der Entstehung von Neuroblastomen in Betracht zu ziehen. Außerdem spielt N-Myc, die in Neuroblastomen exprimierte Isoform von c-Myc, in diesen Tumoren eine entscheidende Rolle. Die Amplifikation des *MYCN*-Gens, stellt einen Marker einer schlechten Prognose für den Patienten dar (Brodeur et al., 1984; Seeger et al., 1985; Brodeur, 1990). Die erhöhte Menge von N-Myc beschleunigt das Wachstum des Neuroblastoms. Es konnte gezeigt werden, dass E2F-1, E2F-2 und E2F-3 den *MYCN*-Promotor in Neuroblastomzellen binden und aktivieren können (Strieder and Lutz, 2003). Damit induziert E2F-1 in Neuroblastomzellen zwei Onkogene, *MYCN* und *BM11*, die kooperativ die Tumorgenese begünstigen. Deshalb war für uns von Interesse, ob und in welchem Ausmaß *BM11* in Neuroblastomen exprimiert wird. Durch Untersuchung der BMI1-Proteinmenge in 68 primären Neuroblastomen konnte gezeigt werden, dass rund 94% der Tumore nach Vergleich mit der Neuroblastomzelllinie SH-EP als BMI1-positiv eingeschätzt wurden (Abbildung 27, Abbildung 28, Tabelle 5). Aufgrund dessen kann vermutet werden, dass BMI1 in Neuroblastomen eine wichtige Rolle zukommt. Eine Fehlregulation von E2F-1 in Neuroblastomen könnte damit die potentielle Ursache der Tumorentstehung durch Induktion von *BM11* und die Grundlage der Progression durch Aktivierung von *MYCN* sein.

In Neuroblastomen, in denen *MYCN* amplifiziert im Vergleich zu einer Kopie des Gens vorlag, unterschieden sich die BMI1-Mengen nicht (Tabelle 6). Dies kann dadurch erklärt werden, dass die E2Fs nicht für die Amplifikation des *MYCN*-Gens, sondern für die Aktivierung verantwortlich sind (Strieder and Lutz, 2003). Die Genamplifikation bietet nur die Grundlage für eine stark erhöhte *MYCN*-Expression nach E2F-Fehlregulation.

Die in dieser Doktorarbeit belegte, erhöhte Menge von BMI1 in Neuroblastomen zusammen mit seiner Rolle in vielen anderen Tumoren empfiehlt dieses Onkogen für die Entwicklung von Inhibitoren zur Tumorthherapie.

### 5.1.7 Die Rolle von BMI1 während der Seneszenz

Seneszenz ist das irreversible Arretieren von Zellen im Zellzyklus und stellt damit auch eine Barriere für die ungehinderte Proliferation von Tumorzellen dar (Braig et al., 2005). In diesem Hinblick scheint die Repression von *BMII* während der Seneszenz notwendig zu sein. In humanen, diploiden Fibroblasten WI-38 konnte eine Reduktion der *BMII*-mRNA und BMI1-Proteinmenge in seneszenten im Vergleich zu präseneszenten Zellen nachgewiesen werden (Itahana et al., 2003). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die in primären, *Bmi1*-defizienten MEFs induzierte vorzeitige Seneszenz hauptsächlich von der Derepression des *INK4A*-Lokus abhängt (Jacobs et al., 1999a). Die Regulation von *BMII* durch E2F-1 in diesem Prozess wird durch die Tatsache interessant, dass E2F-1-Zielgene während der Seneszenz inhibiert werden (Narita et al., 2003). Durch E2F/Pocketprotein-Komplexe kommt es an E2F-Zielgenpromotoren zur Bildung so genannter SAHF (senescence-associated heterochromatic foci, Seneszenz-assoziierten, heterochromatischen Fokusse), die eine stabile Repression dieser E2F-Zielgene zur Folge hat. In primären MEFs, die bis zur Seneszenz passagiert wurden, konnte im Rahmen dieser Doktorarbeit keine Reduktion von *Bmi1* auf mRNA- oder Proteinebene nachgewiesen werden (Abbildung 30, Abbildung 31). Da die Expression von *INK4A*, wie erwartet, eine deutliche Erhöhung zeigte, kann ausgeschlossen werden, dass die MEFs noch nicht seneszent waren. Weil die ursprünglichen Experimente zu BMI1 in der Seneszenz in humanen Fibroblasten durchgeführt wurden, kann ein Organismen-spezifischer Effekt in Erwägung gezogen werden. Deshalb wurde die Expression von *BMII* zusätzlich in WI-38-Zellen analysiert. Die Zellen zeigten, basierend auf morphologischen Veränderungen und dem Nachweis der Seneszenz-assoziierten  $\beta$ -Galaktosidase, nach einigen Passagen einen seneszenten Phänotyp (Abbildung 32). Jedoch konnte weder eine Repression von *BMII*, noch von der positiven Kontrolle PCNA bei der Seneszenz gezeigt werden (Narita et al., 2003) (Abbildung 33). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass andere zelluläre Vorgänge zu den morphologischen Veränderungen der Zellen geführt haben. Außerdem muss in Betracht gezogen werden, dass die von uns verwendeten WI-38-Zellen sich von den Zellen, in denen eine Hemmung der *BMII*-Expression im Verlauf der Seneszenz ursprünglich gezeigt wurde, unterscheiden. Somit konnte die Funktion der Regulation von *BMII* durch E2F-1 nicht näher untersucht werden und es kann keine Aussage über die Rolle dieser Interaktion in der Seneszenz gemacht werden.

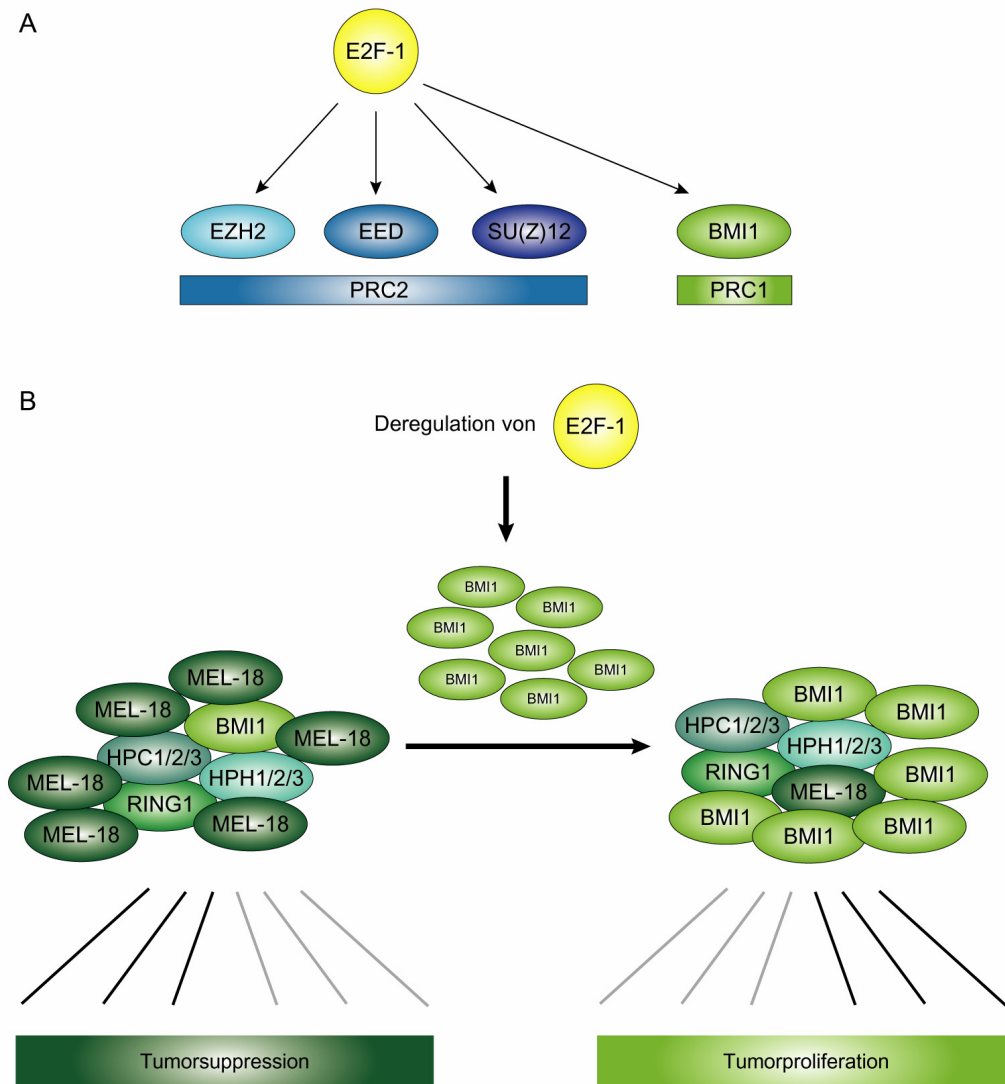


Zu erwähnen ist trotzdem, dass durch Überexpression von *BMII* in WI-38-Zellen, die Seneszenz nicht aufgehoben, sondern nur verzögert werden konnte (Itahana et al., 2003). Das legt den Verdacht nahe, dass die Repression von *BMII* für die Seneszenz von Zellen nicht essentiell ist. So ist vorstellbar, dass *BMII* lediglich zu den vielen E2F-1-Zielgenen gehört, die während der Seneszenz durch SAHF-Bildung reprimiert werden und deren Inhibition fördernd aber nicht notwendig ist.

### **5.1.8 Die biologische Relevanz der Induktion von BMI1 durch E2F-1**

Nachdem in dieser Doktorarbeit gezeigt werden konnte, dass BMI1 durch E2F-1 induziert werden kann, stellt sich die Frage nach der Relevanz dieser Interaktion. Zunächst scheint es widersprüchlich zu sein, dass E2F-1 neben der *ARF*- auch die *BMII*-Expression erhöht, da BMI1 ein Repressor von *ARF* ist (Bates et al., 1998; Jacobs et al., 1999a). Neben der *ARF*-Regulation hat BMI1 als Teil des PRC1 jedoch noch etliche andere Funktionen, wie zum Beispiel die Repression der *HOX*-Gene, die von Bedeutung sind. Diese dürfen bei der Betrachtung der Relevanz einer Erhöhung der BMI1-Mengen durch E2F-1 nicht außer Acht gelassen werden. Besonders auf Polycomb-Komplexe scheint E2F-1 einen Einfluss zu haben, da es neben BMI1 noch andere Polycomb-Proteine reguliert. So aktiviert E2F-1 die Expressionen von *EZH2*, *EED* (humanes Ortholog von *Esc*) und *SU(Z)12*, die für Polycomb-Proteine des PRC2 kodieren (Abbildung 45A). Diese Proteine der Polycomb-Gruppe spielen wie BMI1 eine Rolle in Tumoren, was durch die Erhöhung ihrer Mengen in verschiedenen Tumorarten belegt wird. Neben erhöhten BMI1-Mengen treten so zum Beispiel Amplifikationen oder Steigerungen der mRNA-Mengen von *EZH2*, *RING1* und *SU(Z)12* in Brust-, Darm-, Leber- und Prostata Tumoren auf (Bracken et al., 2003; (Kirmizis et al., 2003; Weikert et al., 2005; Bachmann et al., 2006; van Leenders et al., 2007). Die Erhöhung der Mengen von Polycomb-Proteinen, wie zum Beispiel BMI1, durch dereguliertes E2F-1 scheint somit eine wichtige Rolle für die Tumorgenese zu spielen. Doch weshalb reguliert E2F-1 nur die Expression einiger Komponenten der Polycomb-Komplexe? Diese Spezifität kann zum einen durch die Funktion einzelner Komponenten erklärt werden. *EZH2* ist zum Beispiel die katalytische Komponente des PRC2, da es die Methylase-Aktivität besitzt. Durch die Induktion von *EZH2* durch E2F-1 könnte somit die Aktivität des PRC2 erhöht werden. Zum anderen könnte eine

Mengensteigerung bestimmter Komponenten die Zusammensetzung der Komplexe verändern. Es wird diskutiert, dass dies in einer anderen Zielgenspezifität resultiert (Jacobs and van Lohuizen, 2002).



**Abbildung 45: Zielgene von E2F-1, die Polycomb-Proteine kodieren und die mögliche Veränderung der Zusammensetzung des PRC1 nach Deregulation von E2F-1.** A) *EZH2*, *EED* und *SU(Z)12* kodieren Komponenten des PRC2 und werden wie *BMI1* durch E2F-1 aktiviert. B) Die Deregulation von E2F-1 kann über die Induktion von *BMI1* zu erhöhten BMI1-Mengen im PRC1 und infolge dessen zu einer veränderten Zielgenspezifität führen. Da BMI1 im Gegensatz zu MEL-18 die Tumorphiliferation begünstigt, könnte dies die biologische Relevanz der Aktivierung von *BMI1* durch E2F-1 darstellen. HPC1/2/3...humane Orthologe zu Pc in *Drosophila melanogaster*. HPH1/2/3...humane Orthologe zu Ph in *Drosophila melanogaster*. RING1... humanes Ortholog zu Ring in *Drosophila melanogaster*.

Durch Erhöhung der BMI1-Mengen nach Induktion durch E2F-1 würde damit auch der Anteil von BMI1 im PRC1 steigen (Abbildung 45B). Die relativen Mengen von MEL-18, dass zwar eine große Sequenzhomologie jedoch andere Funktionen als BMI1 hat,

wären im PRC1 geringer. Im Gegensatz zu MEL-18, das u. a. durch Reduktion der PKB-Aktivität Tumor-suppressiv ist, wirkt BMI1 proliferationsfördernd (Kanno et al., 1995; Guo et al., 2007b). Zusätzlich hemmt MEL-18 die *BMI1*-Expression, was zu einer verringerten replikativen Lebensspanne von humanen Fibroblasten führt (Guo et al., 2007a; Guo et al., 2007b). Deshalb würden durch einen Polycomb-Komplex mit hohen BMI1-Mengen wahrscheinlich andere Zielgene reprimiert werden als durch einen Komplex mit überwiegend MEL-18. So könnte die biologische Relevanz der Erhöhung der BMI1-Expression durch dereguliertes E2F-1 eine gesteigerte Proliferation von Tumorzellen sein. Inwiefern der Anteil von BMI1 im PRC1 in Tumoren mit E2F-Deregulation verändert ist, wurde bisher nicht ermittelt. Durch die Ergebnisse dieser Doktorarbeit rücken die Untersuchung der Polycomb-Komplexe und deren Zusammensetzung in Tumoren stärker in den Blickpunkt. In welchem Umfang E2F-1 die Funktionen der Polycomb-Komplexe durch Induktion einiger Komplexkomponenten beeinflusst, ist dabei von besonderem Interesse.

## 5.2 Die Charakterisierung und Einordnung der Regulation von FOXO1 und FOXO3a durch E2F-1

Zu Beginn meiner Doktorarbeit war durch Mitarbeiter der Arbeitsgruppe schon bestätigt worden, dass auch *FOXO1* und *FOXO3a* direkte Zielgene von E2F-1 sind (Daten von Christine Gessner). Alle Versuche waren dabei mit verschiedenen Neuroblastom-zelllinien durchgeführt worden. In dieser Doktorarbeit wurde die Verbreitung und Funktion dieser Regulation näher untersucht.

### 5.2.1 Die Spezifität der Induktion der FOXOs durch E2F-1

Für die Regulation der FOXOs durch E2F-1 war von Interesse, ob sie in verschiedenen Zelltypen und Organismen konserviert ist. Anhand der Spezifität einer Interaktion können Aussagen zu dessen Rolle in verschiedenen zellulären Programmen gemacht werden. Eine Regulation in verschiedenen Organismen und Zelltypen würde zum Beispiel darauf hindeuten, dass diese Interaktion für ein generelles zelluläres Programm, wie zum Beispiel Wachstum oder Metabolismus, von Relevanz ist. Dagegen weist eine Regulation in bestimmten Organismen oder Zelltypen auf eine spezielle Funktion in der Zelle hin. Außerdem lag ein Vergleich zur Induktion von BMI1 durch E2F-1, die in verschiedenen Organismen stattfindet, nahe.

Während die Expression von *FOXO1* und *FOXO3a* durch aktiviertes E2F-1-ER in humanen U2OS und BJ-Fibroblasten erhöht wurde, änderte sie sich in humanen HeLa-Zellen nicht (Abbildung 34). Des Weiteren war die Induktion der FOXOs durch E2F-1 von einem Mitglied der Arbeitsgruppe in verschiedenen humanen Neuroblastom-zelllinien bestätigt worden (Daten von Christine Gessner). Damit lag möglicherweise eine spezifische Regulation von *FOXO1* und *FOXO3a* durch E2F-1 in einem Gewebe vor. Die Spezifität dieser Induktion legt nahe, dass es ein spezielles zelluläres Programm gibt, bei dem die Aktivierung der FOXOs durch E2F-1 von Bedeutung sein könnte. Der Vergleich von humanen BJ-Fibroblasten mit immortalisierten Maus-fibroblasten NIH3T3 weist außerdem auf eine mögliche Organismen-spezifische Regulation hin. Die Induktion der FOXOs durch E2F-1 war nur in BJ-Zellen erkennbar, während E2F-1 die Expression von *FOXO1* und *FOXO3a* in NIH3T3 nicht stimulierte.

Dieses Ergebnis war unerwartet, da auch im proximalen Bereich der murinen Promotoren von *FOXO1* und *FOXO3a* vermeintliche E2F-Bindungsstellen liegen, die den Sequenzen in den Promotoren des Menschen entsprechen (Daten nicht gezeigt). Um eine konkrete Aussage über diese Regulation in verschiedenen Spezies machen zu können, müssten zumindest weitere Mauszelllinien analysiert werden.

### **5.2.2 Der Einfluss von E2F-1 und verschiedenen E2F-1-Mutanten auf den proximalen *FOXO1*-Promotor**

Durch eine Reportergenanalyse sollte geklärt werden, ob die proximal liegenden E2F-Bindungsstellen im *FOXO1*-Promotor für die Aktivierung von Bedeutung sind. Außerdem sollte der Effekt von verschiedenen E2F-1-Mutanten auf die Induktion von *FOXO1* analysiert werden. So sollte ermittelt werden, ob die DNA-Bindung und die Transaktivierung von E2F-1 zur Induktion von *FOXO1* notwendig sind.

Durch den Luziferase-Assay konnte gezeigt werden, dass E2F-1 über den proximalen Bereich mit E2F-Bindungsstellen den *FOXO1*-Promotor aktiviert (Abbildung 36). Durch Mutation der bei +1 gelegenen E2F-Bindungsstelle war bereits der Anteil dieser Bindungssequenz von E2F am Gesamtumfang der Induktion untersucht worden (Daten von Christine Gessner). Die Aktivierung war im Vergleich zum Konstrukt mit dem Wildtyp-*FOXO1*-Promotor verringert, jedoch konnte E2F-1 weiterhin das Reportergen induzieren. Somit kann geschlussfolgert werden, dass E2F-1 über mehrere Bindungsstellen im *FOXO1*-Promotor auf FOXO1 aktivierend wirkt. Durch Mutation aller drei proximalen E2F-Bindungsstellen könnte festgestellt werden, ob diese Sequenzen hinreichend für eine Stimulierung des *FOXO1*-Promotors durch E2F-1 sind. Dies ist jedoch nicht möglich, da eine E2F-Bindungsstelle mit dem Haupttranskriptionsstart überlappt und das Ergebnis nach Mutation in dem Bereich somit nicht interpretierbar wäre.

Dann war von Interesse, welche E2F-1-Domänen zur Induktion notwendig sind, um die Art der Regulation zu analysieren. Zum Beispiel wäre möglich, dass E2F-1 selbst nicht aktiviert, sondern andere Aktivatoren zum *FOXO1*-Promotor rekrutiert. Eine andere Möglichkeit wäre, dass E2F-1 seinerseits durch andere Proteine rekrutiert wird und nicht direkt an den *FOXO1*-Promotor bindet. Um dies näher zu untersuchen, wurden verschiedene E2F-1-Mutanten im Luziferase-Assay eingesetzt. Das verwendete,

trunkierte E2F-1-Protein (E2F-1 1-374) kann aufgrund der teilweisen Deletion der Transaktivierungsdomäne E2F-1-Zielgene nicht mehr aktivieren, es ist jedoch noch zur Bindung an DNA fähig (Zhang et al., 1999). Es wurde daher beschrieben, dass es durch Konkurrenz mit dem endogenen Wildtyp-E2F-1 als dominant-negatives Protein wirkt (Phillips et al., 1997). Die Aktivierung von E2F-1-ER 1-374 resultierte jedoch in einer Induktion des Reportergenkonstruktes, wenngleich die Änderung im Vergleich zum Wildtyp-E2F-1 nur etwa halb so groß war (Abbildung 36). Durch die Deletion der letzten 63 Aminosäuren besitzt dieses E2F-1-Protein keine Pocketprotein-Bindungsdomäne mehr. Reprimierende Pocketproteine können E2F-1 1-374 nicht mehr binden und es kompetiert somit auch mit E2F/pRB-Komplexen um die DNA-Bindung. Deshalb kann bei Verwendung von diesem trunkierten E2F-1 ebenfalls eine Derepression erfolgen (Zhang et al., 1999; Rowland et al., 2002). In diesem Reporter Versuch überwiegt diese Derepression, durch Verdrängung von inhibierenden E2F/Pocketprotein-Komplexen, der Repression, durch Konkurrenz mit zur Transaktivierungsfähigem E2F-1. Das lässt vermuten, dass in den asynchron proliferierenden SH-EP-Zellen vorrangig reprimierende E2F/Pocketprotein-Komplexe am *FOXO1*-Promotor gebunden sind und diesen inhibieren. Erst durch die Transfektion mit Wildtyp- oder mutiertem E2F-1 und damit Einbringen von hohen E2F-1-Mengen wurden diese Komplexe verdrängt, was eine Derepression zur Folge hatte.

Die Mutation von Glutamat an Position 132 (E132) im E2F-1-Protein resultiert im Verlust der Bindung an DNA (McCann et al., 1997). Wie erwartet, zeigte die Induktion von E2F-1-ER E132 durch 4-OHT keine erhöhte sondern eine verringerte Reportergenaktivität (Abbildung 36). E2F-1 E132 ist ebenfalls in der Lage, DP-Proteine zu binden, die heterodimerisiert mit E2F-1 die transkriptionale Aktivierung verstärken (Krek et al., 1993; Phillips et al., 1997). Somit kann das überexprimierte, DNA-Bindungs-defiziente E2F-1 mit dem endogenen Wildtyp-E2F-1 um die DP-Bindung kompetitieren (Phillips et al., 1997). Dies war die Ursache der gemessenen Repression des Reportergenkonstruktes nach Aktivierung von E2F-1-ER E132. Außerdem wird deutlich, dass E2F-1 nicht über andere Proteine zur DNA rekrutiert wird, sondern nur über seine DNA-Bindungsdomäne mit dem *FOXO1*-Promotor assoziieren kann. Die Bindung von E2F-1 an die DNA ist somit die Voraussetzung für die Verdrängung von reprimierenden E2F/Pocketprotein-Komplexen, was zur Derepression des *FOXO1*-Promotors führt.

### 5.2.3 Die Rolle von FOXO1 und FOXO3a bei der Induktion der Apoptose durch E2F-1

Mehrere Fakten ließen eine nähere Untersuchung der Regulation der FOXOs in der E2F-1-induzierten Apoptose für sinnvoll erscheinen. Zunächst stellt *BIM* ein Zielgen der FOXOs und von E2F-1 dar, dass während der Induktion der Apoptose aktiviert wird (Hershko and Ginsberg, 2004; Sunters et al., 2003; Gilley et al., 2003). Die E2F-1-vermittelte Apoptose als auch die FOXOs werden durch Akt inhibiert und der NGF- $\beta$ -Entzug in neuronalen Zellen führt zur Aktivierung der FOXOs und E2F-1. Des Weiteren sprachen verschiedene genetische Veränderungen in neuronalen Tumoren für eine relevante Verbindung der FOXOs mit E2F-1 bei der Induktion der Apoptose (siehe 1.5.7).

Zunächst wurden Untersuchungen in TOR7dnF-Zellen, in denen sowohl E2F-1 als auch dominant-negatives FOXO induziert werden können, durchgeführt. Zwar lies sich bestätigen, dass *BIM* in diesen Zellen ein E2F-1-Zielgen ist, jedoch änderte sich die *BIM*-Expression bei Induktion von *dnFOXO* allein oder in Verbindung mit E2F-1 nicht (Abbildung 39). Auch bewirkte die Expression des *dnFOXO* unabhängig von aktivem E2F-1 keine Änderung der Apoptoseraten (Gilley et al., 2003; Nowak et al., 2007). Diesen Ergebnissen können folgende Ursachen zugrunde liegen.

1. Die Behandlung mit Doxyzyklin führt in den Zellen nicht zu einer Bildung von dnFOXO.
2. Die FOXOs sind nicht aktiv und in Folge dessen kann dnFOXO nicht wirken.
3. Dominant-negatives FOXO zeigt an sich keine Wirkung auf FOXOs.
4. Die Kompetition des dnFOXOs mit den endogenen FOXOs reicht nicht aus, um eine negative Regulation der *BIM*-Expression zu zeigen.
5. *BIM* stellt in SH-EP- bzw. TOR7dnF-Zellen kein FOXO-Zielgen dar.

Im Vorfeld der Experimente wurde die Bildung von dnFOXO nach Doxyzyklin-Behandlung von einer Mitarbeiterin mittels Western Blots überprüft. Da das dnFOXO einen HA-tag besitzt, konnte die induzierte Menge dnFOXO unabhängig von der endogenen FOXO-Menge betrachtet werden. Demnach wurde nach Gabe von Doxyzyklin eine große Menge dnFOXO gebildet (Nowak et al., 2007). Das dnFOXO aufgrund der mangelnden Funktionstüchtigkeit der endogenen FOXOs nicht wirkte, kann nicht vollständig ausgeschlossen werden. Eine Mitarbeiterin konnte zeigen, dass GFP-gekoppeltes FOXO zum Großteil im Nukleus von TOR7dnF-Zellen vorliegt und

somit die FOXOs nicht durch Phosphorylierung und Translokalisierung ins Zytoplasma inaktiviert wurden. Jedoch sind noch andere Wege der Hemmung denkbar, wie zum Beispiel die Deacetylierung und Repression der FOXO3a-Aktivität durch SIRT1 (Motta et al., 2004). Im Gegensatz zum dnBMI1 stellt das dominant-negative FOXO, das nur aus der konservierten DNA-Bindungsdomäne der FOXOs besteht, ein vielseitig und oft genutztes Mittel zur Untersuchung der FOXO-Funktion dar (Medema et al., 2000; van den Heuvel et al., 2005; Bouchard et al., 2007; Bouchard et al., 2007). Eine Verringerung der Genexpression durch Verdrängung positiver Transkriptionsfaktoren ist generell schwieriger detektierbar. Deshalb muss in Betracht gezogen werden, dass die Konkurrenz des dnFOXO mit den FOXOs zu gering war, um eine Genexpressionsänderung von *BIM* zu zeigen. Letztendlich kann nicht ausgeschlossen werden, dass *BIM* in diesen Zellen kein FOXO-Zielgen ist.

Um solche Zelltyp-spezifischen Effekte auszuschließen, wurde die Expression von *BIM* nach Aktivierung von E2F-1-ER und *dnFOXO* in U2OS-Zellen analysiert. Die Arbeit einer anderen Gruppe hatte gezeigt, dass FOXO3a an GFP gekoppelt im Zellkern von U2OS zu finden ist (Nakamura et al., 2000). Die Steigerung der mRNA-Mengen der *FOXOs* und von *CCNE1* dienten als Kontrolle der Aktivierbarkeit von E2F-1-ER. Jedoch zeigte sich auch in U2OS-Zellen, unter den verwendeten Bedingungen, kein Effekt des dnFOXO auf die Genexpression von *BIM* (Abbildung 41, Abbildung 42). Mittels semiquantitativer PCRs konnte die Expression des *dnFOXO* in den U2OS-Zellen belegt werden (Abbildung 40). Gezielte Untersuchungen könnten auch hier weitere mögliche Ursachen bestätigen oder widerlegen. Doch bis dahin muss die Schlussfolgerung gezogen werden, dass FOXOs für die E2F-1-vermittelte Induktion von *BIM* und der Apoptose nicht benötigt werden.

Die ursprünglich aufgestellte Hypothese legte speziell eine Rolle der FOXOs für die Funktion von E2F-1 in der neuronalen Apoptose nahe. Um die, bei Verwendung des dnFOXO entstandenen, Probleme zu vermeiden und ein anderes Modellsystem der neuronalen Apoptose zu untersuchen, wurde die durch NGF- $\beta$ -Entzug eingeleitete Apoptose in PC12-Zellen näher betrachtet. Nach neuronaler Differenzierung der PC12-Zellen mit NGF- $\beta$  kann durch Entzug dieses Wachstumsfaktors Apoptose induziert werden. Dabei sind die Derepression von E2F-Zielgenen und eine Erhöhung der E2F-1-Menge essentiell (Liu and Greene, 2001). Wäre eine Aktivierung von FOXO1 und



FOXO3a durch E2F-1 für diese neuronale, E2F-1-vermittelte Apoptose notwendig, müsste eine Genexpressionserhöhung der *FOXOs* stattfinden. Nach Entzug von NGF- $\beta$  fanden morphologische Veränderungen statt, die auf Apoptose hinwiesen (Abbildung 43). Der Vergleich der Genexpression von *FOXO1* und *FOXO3a* vor und nach NGF- $\beta$ -Entzug zeigte jedoch keinen Unterschied (Abbildung 44). Dafür gibt es im Wesentlichen drei mögliche Erklärungen:

1. Nach Entzug des Wachstumsfaktors wurde keine Apoptose eingeleitet.
2. Die verwendeten PC12-Zellen stellen einen Subklon dar, der sich von den in der Literatur verwendeten Zellen unterscheidet.
3. Die *FOXOs* sind bei der neuronalen E2F-1-vermittelten Apoptose nicht von Bedeutung.

Ein Teil der beobachteten, morphologischen Veränderung der PC12-Zellen nach NGF- $\beta$ -Entzug könnte mit einer Dedifferenzierung begründet werden. Das würde zumindest die Rückentwicklung der Fortsätze und Auflösung der Netz-artigen Strukturen erklären. Jedoch blieben die anderen morphologischen Veränderungen offen und solch eine Dedifferenzierung nach NGF- $\beta$ -Entzug wurde bisher nicht beschrieben. Mit geeigneten Untersuchungssystemen für Rattenzellen wäre es möglich, die Apoptose aufgrund bekannter Marker, wie PARP-Spaltung (**P**oly (**A**DP-**r**ibose) **p**olymerase, Poly-ADP-Ribose-Polymerase) oder Kaspase 3-Aktivierung, auch auf molekularer Ebene zu belegen. Damit könnte diese mögliche Erklärung bestätigt oder widerlegt werden. Da sich die PC12-Zellen schon seit Jahrzehnten in verschiedenen Laboren in Kultur befinden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich unterschiedliche Subklone entwickelt haben. In diesen können sich Signalwege, wie zum Beispiel die Apoptose, durch Mutationen verändert haben, so dass andere Abhängigkeiten bestehen. Um dieses Problem zu beheben, müsste die Untersuchung mit PC12-Zellen aus anderer Quelle wiederholt werden. Am Wahrscheinlichsten ist jedoch, dass zur Induktion der Apoptose von neuronal differenzierten Zellen die Aktivierung der *FOXOs* durch E2F-1 nicht notwendig ist. Um herauszufinden, ob *FOXO1* und *FOXO3a* generell für die E2F-1-induzierte Apoptose eine Rolle spielen, müsste eine Analyse bei fehlenden *FOXOs* durchgeführt werden. Denn erst wenn nach Verlust von *FOXO1* und *FOXO3a* das Einsetzen der Apoptose untersucht wird, kann eine abschließende Aussage zur Notwendigkeit der beiden *FOXOs* für diese E2F-1-Funktion gemacht werden.

### 5.3 Ausblick: Die Rolle der Regulationen von *FOXOs* und *BMI1* für andere Funktionen von E2F-1

Neben der Apoptose gibt es noch eine Reihe von anderen zellulären Programmen, in denen die Regulation der FOXOs durch E2F-1 von Bedeutung sein könnte. Daf-16, das FOXO-Ortholog in *Caenorhabditis elegans*, erlangte große Aufmerksamkeit durch seine lebensverlängernde Wirkung. Die Lebenszeit von *Caenorhabditis elegans* verlängerte sich bis zu dreifach, wenn Mutationen im Insulinrezeptor oder der PI3K eingeführt wurden (Kenyon et al., 1993; Morris et al., 1996) und somit mehr aktives Daf-16 vorhanden war. Diese Verlängerung der Lebensspanne trat nicht auf, wenn zusätzlich *Daf-16* mutiert wurde (Lin et al., 1997; Ogg et al., 1997). Analog dazu zeigten Mäuse, in denen der Insulinrezeptor im Fettgewebe ausgeschaltet wurde, eine mittlere Erhöhung der Lebensspanne um 18% (Bluher et al., 2003). Dies deutet an, dass die FOXO-Aktivität auch in Säugetieren für die Verlängerung der Lebenszeit notwendig sein könnte. Bisher wurde jedoch die Länge der Lebenszeit von Säugetieren bei Verlust oder Inaktivierung der FOXOs nicht näher untersucht. Die Wirkung der FOXOs auf die Lebenszeit von *Caenorhabditis elegans* hatte sich nur im Kontext eines defekten Insulinsignalweges gezeigt. Zur endgültigen Aufklärung wären deshalb Untersuchungen nötig, bei denen zum Beispiel zusätzlich der Insulinrezeptor mutiert ist. Allerdings wird durch die Ergebnisse in *Caenorhabditis elegans* und in *Mus musculus* deutlich, dass die FOXOs die Seneszenz hemmen. Einher geht damit der Befund, dass die Reduzierung der *FOXO3a*-mRNA durch RNA-Interferenz die zelluläre Seneszenz in humanen, dermalen Fibroblasten beschleunigt (Kyoung et al., 2005). Diese Rolle der FOXOs wird besonders interessant durch den Fakt, dass die Reduktion der DP/E2F-Aktivität in humanen Fibroblasten und einigen Tumorzelllinien Seneszenz induzieren kann (Maehara et al., 2005). Außerdem ist bekannt, dass die Expression etlicher E2F-Zielgene während der Seneszenz reduziert wird (Narita et al., 2003). Deshalb wäre die Untersuchung der Regulation der FOXOs durch E2F-1 in der Seneszenz von großem Interesse.

Ferner könnte diese Interaktion eine wichtige Rolle in der Tumorentwicklung bzw. -progression spielen. Kürzlich konnte durch somatische Deletion aller Allele von FOXO1, FOXO3a und FOXO4 in *Mus musculus* deren Status als Tumorsuppressoren

bestätigt werden (Paik et al., 2007). Im Vergleich zu allen Kontrolltieren entwickelten Mäuse ohne diese drei FOXOs im Durchschnitt nach rund 25 Wochen mit hoher Penetranz Lymphome (Paik et al., 2007). Schon lange war bekannt, dass viele Tumorarten eine konstitutive Aktivierung des PI3K-Signalweges aufweisen. Dadurch kommt es zur vermehrten Phosphorylierung und damit Inaktivierung der pro-apoptotischen FOXOs. Bereits die Identifizierung des *FOXO*-Gens als Fusionspartner von *PAX3* und *PAX7* in Rhabdomyosarkomen, legte nahe, dass die Dimerisierung dieser Gene und damit der Verlust der korrekten Proteine für die Tumorbildung nützlich ist (Davis et al., 1995). Da in etlichen Tumorarten eine Fehlregulation des E2F/Pocketprotein-Signalweges ein onkogenes Ereignis darstellt, wäre die Analyse der Induktion der *FOXOs* durch E2F-1 in Tumoren von großer Bedeutung. Dies wird dadurch unterstrichen, dass FOXOs immer stärker als eventuelle therapeutische Ziele diskutiert werden.

Ein weiteres Programm, in dem diese Regulation von Bedeutung sein könnte, ist die Entwicklung. Neben den bekannten Funktionen von E2F in der Zellzyklusregulation und Apoptose, besitzt es auch eine essentielle Rolle in der Embryogenese der Vertebraten. Untersuchungen am Krallenfrosch *Xenopus laevis* verdeutlichen, dass xE2F, das E2F-Analog in *Xenopus laevis*, ein wichtiger Regulator der Bildung der Embryonalachse ist (Suzuki and Hemmati-Brivanlou, 2000). Durch Regionen-spezifische Aktivierung von verschiedenen Zielgenen wird die Bildung der Körperachsen ermöglicht. Auch für die FOXO-Proteine sind Funktionen während der Embryonalentwicklung belegt. So sterben *FOXO1*-defiziente Mäuse um den Embryonaltag 11 aufgrund veränderter Angiogenese im Dottersack und in den Embryonen selbst (Furuyama et al., 2004). Die Defizienz von *FOXO3a* und *FOXO4* allein bewirkt nicht den Tod der Tiere während der Embryonalentwicklung (Hosaka et al., 2004). Jedoch werden *FOXO3a*-defiziente Weibchen durch eine anormale Entwicklung der Follikel im Eierstock frühzeitig unfruchtbar (Hosaka et al., 2004). Eine Hemmung der FOXOs bei gleichzeitiger Aktivierung von E2F in verschiedenen Organismen könnte die Rolle der FOXOs für die E2F-Funktion in der Entwicklung aufdecken. Voraussetzung dafür wäre, dass die FOXOs auch in anderen Organismen durch E2F-1 aktiviert werden können. Die Funktion von E2F in der Embryonalentwicklung rückt ebenfalls in den Blickpunkt, wenn die Induktion von *BM11* betrachtet wird. Als Teil des PRC1 ist BMI1 an der Aufrechterhaltung der stabilen Repression der *HOX*-Gene während der Embryonal-

entwicklung beteiligt (Paro, 1995). Da die exakte Zusammensetzung von Polycomb-Komplexen dynamisch und Zelltyp-spezifisch ist, könnte die Anreicherung von BMI1 durch E2F-1 einen starken Einfluss darauf haben. Interaktionen mit anderen Proteinen und die Wirkung des PRC1 auf Zielgene könnten dadurch beeinflusst werden. Die Mutation der E2F-Bindungsstelle im *BMI1*-Promotor bereits im Embryo wäre nur eine Möglichkeit dem auf den Grund zu gehen.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Der Transkriptionsfaktor BMI1 gehört zu den Polycomb-Proteinen und ist für die embryonale Entwicklung und die Aufrechterhaltung des proliferativen Potentials von Stammzellen notwendig. FOXO1 und FOXO3a sind Mitglieder der Untergruppe O der Forkhead-Transkriptionsfaktoren und zeichnen sich durch wichtige Funktionen in zellulären Prozessen wie Apoptose, Zellzyklusarrest oder Glukosemetabolismus aus. Obwohl Änderungen der Menge oder Funktionstüchtigkeit von BMI1 und den FOXOs in etlichen Tumorarten nachgewiesen wurden, war bisher eine mögliche Regulation ihrer Expression nicht näher untersucht worden. Im Vorfeld meiner Doktorarbeit konnten *BMI1* sowie *FOXO1* und *FOXO3a* als direkte Zielgene des Transkriptionsfaktors E2F-1 identifiziert werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte ich zeigen, dass E2F-1-induziertes BMI1 im Zellkern lokalisiert und an Chromatin gebunden ist und somit wesentliche Voraussetzungen für seine Funktionsweise geschaffen sind. Die Aktivierung von *BMI1* durch E2F-1 in Zellen aus verschiedenen Spezies deutet darauf hin, dass eine konservierte Regulation vorliegt. Anders als die meisten E2F-1-Zielgene wird *BMI1* nicht in der späten G1-Phase verstärkt exprimiert. Daraus kann geschlossen werden, dass die Regulation von BMI1 durch E2F-1 keine Rolle bei der Kontrolle des Zellzyklus spielt. Die BMI1-Mengen in primären Neuroblastomen, deren Entstehung aus Stammzellen der Neuralleiste nicht näher untersucht ist, wurden von mir ermittelt. Über 90% dieser Tumore zeigten hohe BMI1-Mengen, weshalb eine Rolle von BMI1, das für die Stammzellproliferation essentiell ist, in der Tumorgenese von Neuroblastomen vermutet werden kann.

Im Gegensatz zu *BMI1* werden *FOXO1* und *FOXO3a* durch E2F-1 wahrscheinlich in gewebs-spezifischer Weise reguliert. Ich konnte zeigen, dass *BMI1* und die beiden *FOXOs* auch schon von physiologischer E2F-1-Aktivität induziert werden können. In verschiedenen Modellen untersuchte ich die Rolle der FOXOs in der E2F-1-induzierten Apoptose. Dabei wurde deutlich, dass während der Induktion der neuronalen Apoptose die *FOXOs* durch E2F-1 nicht aktiviert werden. Aufgrund dieser Beobachtungen kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass FOXO1 und FOXO3a eine Funktion in der E2F-1-abhängigen Apoptose wahrnehmen.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

Akasaka,T., Kanno,M., Balling,R., Mieza,M.A., Taniguchi,M., and Koseki,H. (1996). A role for mel-18, a Polycomb group-related vertebrate gene, during theanteroposterior specification of the axial skeleton. *Development* 122, 1513-1522.

Alkema,M.J., Jacobs,H., van Lohuizen,M., and Berns,A. (1997). Pertubation of B and T cell development and predisposition to lymphomagenesis in Emu Bmi1 transgenic mice require the Bmi1 RING finger. *Oncogene* 15, 899-910.

Alkema,M.J., van der Lugt,N.M., Bobeldijk,R.C., Berns,A., and van Lohuizen,M. (1995). Transformation of axial skeleton due to overexpression of bmi-1 in transgenic mice. *Nature* 374, 724-727.

Aslanian,A., Iaquina,P.J., Verona,R., and Lees,J.A. (2004). Repression of the Arf tumor suppressor by E2F3 is required for normal cell cycle kinetics. *Genes Dev.* 18, 1413-1422.

Attwooll,C., Lazzerini,D.E., and Helin,K. (2004). The E2F family: specific functions and overlapping interests. *EMBO J.* 23, 4709-4716.

Bachmann,I.M., Halvorsen,O.J., Collett,K., Stefansson,I.M., Straume,O., Haukaas,S.A., Salvesen,H.B., Otte,A.P., and Akslen,L.A. (2006). EZH2 expression is associated with high proliferation rate and aggressive tumor subgroups in cutaneous melanoma and cancers of the endometrium, prostate, and breast. *J. Clin. Oncol.* 24, 268-273.

Balciunaite,E., Spektor,A., Lents,N.H., Cam,H., te,R.H., Scime,A., Rudnicki,M.A., Young,R., and Dynlacht,B.D. (2005). Pocket protein complexes are recruited to distinct targets in quiescent and proliferating cells. *Mol. Cell Biol.* 25, 8166-8178.

Bandara,L.R., Buck,V.M., Zamanian,M., Johnston,L.H., and La Thangue,N.B. (1993). Functional synergy between DP-1 and E2F-1 in the cell cycle-regulating transcription factor DRTF1/E2F. *EMBO J.* 12, 4317-4324.

Bandara,L.R. and La Thangue,N.B. (1991). Adenovirus E1a prevents the retinoblastoma gene product from complexing with a cellular transcription factor. *Nature* 351, 494-497.

Bates,S., Phillips,A.C., Clark,P.A., Stott,F., Peters,G., Ludwig,R.L., and Vousden,K.H. (1998). p14ARF links the tumour suppressors RB and p53. *Nature* 395, 124-125.

Bea,S., Tort,F., Pinyol,M., Puig,X., Hernandez,L., Hernandez,S., Fernandez,P.L., van Lohuizen,M., Colomer,D., and Campo,E. (2001). BMI-1 gene amplification and overexpression in hematological malignancies occur mainly in mantle cell lymphomas. *Cancer Res.* 61, 2409-2412.

Beijersbergen,R.L., Kerkhoven,R.M., Zhu,L., Carlee,L., Voorhoeve,P.M., and Bernards,R. (1994). E2F-4, a new member of the E2F gene family, has oncogenic activity and associates with p107 in vivo. *Genes Dev.* 8, 2680-2690.

Bertz,J., Giersiepen,K., Haberland,J., Hentschel,S., Kaatsch,P., Katalinic,A., Stabenow,R., Stegmaier,C., and Ziegler,H. (2006). Krebs in Deutschland - Häufigkeiten und Trends. (Saarbrücken: Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. und das Robert Koch-Institut).

Berwanger,B., Hartmann,O., Bergmann,E., Bernard,S., Nielsen,D., Krause,M., Kartal,A., Flynn,D., Wiedemeyer,R., Schwab,M., Schafer,H., Christiansen,H., and Eilers,M. (2002). Loss of a FYN-regulated differentiation and growth arrest pathway in advanced stage neuroblastoma. *Cancer Cell* 2, 377-386.

Biggs,W.H., III, Meisenhelder,J., Hunter,T., Cavenee,W.K., and Arden,K.C. (1999). Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 7421-7426.

Biswas,S.C. and Greene,L.A. (2002). Nerve growth factor (NGF) down-regulates the Bcl-2 homology 3 (BH3) domain-only protein Bim and suppresses its proapoptotic activity by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 277, 49511-49516.

Biswas,S.C., Liu,D.X., and Greene,L.A. (2005). Bim is a direct target of a neuronal E2F-dependent apoptotic pathway. *J. Neurosci.* 25, 8349-8358.

Blagosklonny,M.V. (2000). p53 from complexity to simplicity: mutant p53 stabilization, gain-of-function, and dominant-negative effect. *FASEB J.* 14, 1901-1907.

Bluher,M., Kahn,B.B., and Kahn,C.R. (2003). Extended longevity in mice lacking the insulin receptor in adipose tissue. *Science* 299, 572-574.

Bonnet,D. and Dick,J.E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med.* 3, 730-737.

Borkhardt,A., Repp,R., Haas,O.A., Leis,T., Harbott,J., Kreuder,J., Hammermann,J., Henn,T., and Lampert,F. (1997). Cloning and characterization of AFX, the gene that fuses to MLL in acute leukemias with a t(X;11)(q13;q23). *Oncogene* 14, 195-202.

Bouchard,C., Lee,S., Paulus-Hock,V., Loddenkemper,C., Eilers,M., and Schmitt,C.A. (2007). FoxO transcription factors suppress Myc-driven lymphomagenesis *via* direct activation of *Arf*. *Genes Dev.* *akzeptiert*.

Bouchard,C., Marquardt,J., Bras,A., Medema,R.H., and Eilers,M. (2004). Myc-induced proliferation and transformation require Akt-mediated phosphorylation of FoxO proteins. *EMBO J.* 23, 2830-2840.

Bracken,A.P., Ciro,M., Cocito,A., and Helin,K. (2004). E2F target genes: unraveling the biology. *Trends Biochem. Sci.* 29, 409-417.

Bracken,A.P., Kleine-Kohlbrecher,D., Dietrich,N., Pasini,D., Gargiulo,G., Beekman,C., Theilgaard-Monch,K., Minucci,S., Porse,B.T., Marine,J.C., Hansen,K.H., and Helin,K. (2007). The Polycomb group proteins bind throughout the INK4A-ARF locus and are disassociated in senescent cells. *Genes Dev.* 21, 525-530.

- Bracken,A.P., Pasini,D., Capra,M., Prosperini,E., Colli,E., and Helin,K. (2003). EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer. *EMBO J.* 22, 5323-5335.
- Braig,M., Lee,S., Loddenkemper,C., Rudolph,C., Peters,A.H., Schlegelberger,B., Stein,H., Dorken,B., Jenuwein,T., and Schmitt,C.A. (2005). Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature* 436, 660-665.
- Breuer,R.H., Snijders,P.J., Smit,E.F., Sutedja,T.G., Sewalt,R.G., Otte,A.P., van Kemenade,F.J., Postmus,P.E., Meijer,C.J., and Raaphorst,F.M. (2004). Increased expression of the EZH2 polycomb group gene in BMI-1-positive neoplastic cells during bronchial carcinogenesis. *Neoplasia*. 6, 736-743.
- Brodeur,G.M. (1990). Neuroblastoma: clinical significance of genetic abnormalities. *Cancer Surv.* 9, 673-688.
- Brodeur,G.M., Seeger,R.C., Schwab,M., Varmus,H.E., and Bishop,J.M. (1984). Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science* 224, 1121-1124.
- Brownawell,A.M., Kops,G.J., Macara,I.G., and Burgering,B.M. (2001). Inhibition of nuclear import by protein kinase B (Akt) regulates the subcellular distribution and activity of the forkhead transcription factor AFX. *Mol. Cell Biol.* 21, 3534-3546.
- Brunet,A., Bonni,A., Zigmond,M.J., Lin,M.Z., Juo,P., Hu,L.S., Anderson,M.J., Arden,K.C., Blenis,J., and Greenberg,M.E. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96, 857-868.
- Brunet,A., Park,J., Tran,H., Hu,L.S., Hemmings,B.A., and Greenberg,M.E. (2001). Protein kinase SGK mediates survival signals by phosphorylating the forkhead transcription factor FKHL1 (FOXO3a). *Mol. Cell Biol.* 21, 952-965.
- Brunk,B.P., Martin,E.C., and Adler,P.N. (1991). Drosophila genes Posterior Sex Combs and Suppressor two of zeste encode proteins with homology to the murine bmi-1 oncogene. *Nature* 353, 351-353.
- Cam,H., Balciunaite,E., Blais,A., Spektor,A., Scarpulla,R.C., Young,R., Kluger,Y., and Dynlacht,B.D. (2004). A common set of gene regulatory networks links metabolism and growth inhibition. *Mol. Cell* 16, 399-411.
- Cao,Q., Xia,Y., Azadniv,M., and Crispe,I.N. (2004). The E2F-1 transcription factor promotes caspase-8 and bid expression, and enhances Fas signaling in T cells. *J. Immunol.* 173, 1111-1117.
- Cao,R., Tsukada,Y., and Zhang,Y. (2005). Role of Bmi-1 and Ring1A in H2A ubiquitylation and Hox gene silencing. *Mol. Cell* 20, 845-854.
- Cartwright,P., Muller,H., Wagener,C., Holm,K., and Helin,K. (1998). E2F-6: a novel member of the E2F family is an inhibitor of E2F-dependent transcription. *Oncogene* 17, 611-623.



- Castrillon,D.H., Miao,L., Kollipara,R., Horner,J.W., and DePinho,R.A. (2003). Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a. *Science* 301, 215-218.
- Chellappan,S.P., Hiebert,S., Mudryj,M., Horowitz,J.M., and Nevins,J.R. (1991). The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell* 65, 1053-1061.
- Ciccarone,V., Spengler,B.A., Meyers,M.B., Biedler,J.L., and Ross,R.A. (1989). Phenotypic diversification in human neuroblastoma cells: expression of distinct neural crest lineages. *Cancer Res.* 49, 219-225.
- Cohen,K.J., Hanna,J.S., Prescott,J.E., and Dang,C.V. (1996). Transformation by the Bmi-1 oncoprotein correlates with its subnuclear localization but not its transcriptional suppression activity. *Mol. Cell Biol.* 16, 5527-5535.
- Collado,M., Medema,R.H., Garcia-Cao,I., Dubuisson,M.L., Barradas,M., Glassford,J., Rivas,C., Burgering,B.M., Serrano,M., and Lam,E.W. (2000). Inhibition of the phosphoinositide 3-kinase pathway induces a senescence-like arrest mediated by p27Kip1. *J. Biol. Chem.* 275, 21960-21968.
- Coller,H.A., Sang,L., and Roberts,J.M. (2006). A new description of cellular quiescence. *PLoS. Biol.* 4, e83.
- Comings,D.E. (1973). A general theory of carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 70, 3324-3328.
- Conner,E.A., Lemmer,E.R., Omori,M., Wirth,P.J., Factor,V.M., and Thorgeirsson,S.S. (2000). Dual functions of E2F-1 in a transgenic mouse model of liver carcinogenesis. *Oncogene* 19, 5054-5062.
- Cui,H., Hu,B., Li,T., Ma,J., Alam,G., Gunning,W.T., and Ding,H.F. (2007). Bmi-1 is essential for the tumorigenicity of neuroblastoma cells. *Am. J. Pathol.* 170, 1370-1378.
- Cui,H., Ma,J., Ding,J., Li,T., Alam,G., and Ding,H.F. (2006). Bmi-1 regulates the differentiation and clonogenic self-renewal of I-type neuroblastoma cells in a concentration-dependent manner. *J. Biol. Chem.* 281, 34696-34704.
- Daitoku,H. and Fukamizu,A. (2007). FOXO Transcription Factors in the Regulatory Networks of Longevity. *J. Biochem. (Tokyo)* 141, 769-774.
- Davis,R.J., Bennicelli,J.L., Macina,R.A., Nycum,L.M., Biegel,J.A., and Barr,F.G. (1995). Structural characterization of the FKHR gene and its rearrangement in alveolar rhabdomyosarcoma. *Hum. Mol. Genet.* 4, 2355-2362.
- Davis,R.J., D'Cruz,C.M., Lovell,M.A., Biegel,J.A., and Barr,F.G. (1994). Fusion of PAX7 to FKHR by the variant t(1;13)(p36;q14) translocation in alveolar rhabdomyosarcoma. *Cancer Res.* 54, 2869-2872.
- DeGregori,J. and Johnson,D.G. (2006). Distinct and Overlapping Roles for E2F Family Members in Transcription, Proliferation and Apoptosis. *Curr. Mol. Med.* 6, 739-748.

- DeGregori,J., Leone,G., Miron,A., Jakoi,L., and Nevins,J.R. (1997). Distinct roles for E2F proteins in cell growth control and apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *94*, 7245-7250.
- Dellino,G.I., Schwartz,Y.B., Farkas,G., McCabe,D., Elgin,S.C., and Pirrotta,V. (2004). Polycomb silencing blocks transcription initiation. *Mol. Cell* *13*, 887-893.
- Dijkers,P.F., Medema,R.H., Lammers,J.W., Koenderman,L., and Coffey,P.J. (2000). Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1. *Curr. Biol.* *10*, 1201-1204.
- Dik,W.A., Brahim,W., Braun,C., Asnafi,V., Dastugue,N., Bernard,O.A., van Dongen,J.J., Langerak,A.W., Macintyre,E.A., and Delabesse,E. (2005). CALM-AF10+ T-ALL expression profiles are characterized by overexpression of HOXA and BMI1 oncogenes. *Leukemia* *19*, 1948-1957.
- Dimitroulakos,J., Squire,J., Pawlin,G., and Yeager,H. (1994). NUB-7: a stable I-type human neuroblastoma cell line inducible along N- and S-type cell lineages. *Cell Growth Differ.* *5*, 373-384.
- Dimri,G.P., Martinez,J.L., Jacobs,J.J., Keblusek,P., Itahana,K., van Lohuizen,M., Campisi,J., Wazer,D.E., and Band,V. (2002). The Bmi-1 oncogene induces telomerase activity and immortalizes human mammary epithelial cells. *Cancer Res.* *62*, 4736-4745.
- Duronio,R.J. and O'Farrell,P.H. (1995). Developmental control of the G1 to S transition in *Drosophila*: cyclin E is a limiting downstream target of E2F. *Genes Dev.* *9*, 1456-1468.
- Dynlacht,B.D., Flores,O., Lees,J.A., and Harlow,E. (1994). Differential regulation of E2F transactivation by cyclin/cdk2 complexes. *Genes Dev.* *8*, 1772-1786.
- Eilers,M., Picard,D., Yamamoto,K.R., and Bishop,J.M. (1989). Chimeras of myc oncoprotein and steroid receptors cause hormone-dependent transformation of cells. *Nature* *340*, 66-68.
- Ewen,M.E., Xing,Y.G., Lawrence,J.B., and Livingston,D.M. (1991). Molecular cloning, chromosomal mapping, and expression of the cDNA for p107, a retinoblastoma gene product-related protein. *Cell* *66*, 1155-1164.
- Fasano,C.A., Dimos,J.T., Ivanova,N.B., Lowry,N., Lemischka,I.R., and Temple,S. (2007). shRNA knockdown of Bmi-1 reveals a critical role for p21-Rb pathway in NSC self-renewal during development. *Cell Stem Cell* *1*, 87-99.
- Fero,M.L., Randel,E., Gurley,K.E., Roberts,J.M., and Kemp,C.J. (1998). The murine gene p27Kip1 is haplo-insufficient for tumour suppression. *Nature* *396*, 177-180.
- Field,S.J., Tsai,F.Y., Kuo,F., Zubiaga,A.M., Kaelin,W.G., Jr., Livingston,D.M., Orkin,S.H., and Greenberg,M.E. (1996). E2F-1 functions in mice to promote apoptosis and suppress proliferation. *Cell* *85*, 549-561.
- Francis,N.J., Kingston,R.E., and Woodcock,C.L. (2004). Chromatin compaction by a polycomb group protein complex. *Science* *306*, 1574-1577.

Friend,S.H., Bernards,R., Rogelj,S., Weinberg,R.A., Rapaport,J.M., Albert,D.M., and Dryja,T.P. (1986). A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* 323, 643-646.

Fukuoka,M., Daitoku,H., Hatta,M., Matsuzaki,H., Umemura,S., and Fukamizu,A. (2003). Negative regulation of forkhead transcription factor AFX (Foxo4) by CBP-induced acetylation. *Int. J. Mol. Med.* 12, 503-508.

Furuyama,T., Kitayama,K., Shimoda,Y., Ogawa,M., Sone,K., Yoshida-Araki,K., Hisatsune,H., Nishikawa,S., Nakayama,K., Nakayama,K., Ikeda,K., Motoyama,N., and Mori,N. (2004). Abnormal angiogenesis in Foxo1 (Fkhr)-deficient mice. *J. Biol. Chem.* 279, 34741-34749.

Furuyama,T., Nakazawa,T., Nakano,I., and Mori,N. (2000). Identification of the differential distribution patterns of mRNAs and consensus binding sequences for mouse DAF-16 homologues. *Biochem. J.* 349, 629-634.

Galili,N., Davis,R.J., Fredericks,W.J., Mukhopadhyay,S., Rauscher,F.J., III, Emanuel,B.S., Rovera,G., and Barr,F.G. (1993). Fusion of a fork head domain gene to PAX3 in the solid tumour alveolar rhabdomyosarcoma. *Nat. Genet.* 5, 230-235.

Gaubatz,S., Lees,J.A., Lindeman,G.J., and Livingston,D.M. (2001). E2F4 is exported from the nucleus in a CRM1-dependent manner. *Mol. Cell Biol.* 21, 1384-1392.

Gaubatz,S., Lindeman,G.J., Ishida,S., Jakoi,L., Nevins,J.R., Livingston,D.M., and Rempel,R.E. (2000). E2F4 and E2F5 play an essential role in pocket protein-mediated G1 control. *Mol. Cell* 6, 729-735.

Gaubatz,S., Wood,J.G., and Livingston,D.M. (1998). Unusual proliferation arrest and transcriptional control properties of a newly discovered E2F family member, E2F-6. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 9190-9195.

Giannakou,M.E. and Partridge,L. (2004). The interaction between FOXO and SIRT1: tipping the balance towards survival. *Trends Cell Biol.* 14, 408-412.

Gilley,J., Coffey,P.J., and Ham,J. (2003). FOXO transcription factors directly activate bim gene expression and promote apoptosis in sympathetic neurons. *J. Cell Biol.* 162, 613-622.

Ginsberg,D., Vairo,G., Chittenden,T., Xiao,Z.X., Xu,G., Wydner,K.L., DeCaprio,J.A., Lawrence,J.B., and Livingston,D.M. (1994). E2F-4, a new member of the E2F transcription factor family, interacts with p107. *Genes Dev.* 8, 2665-2679.

Giovanni,A., Keramaris,E., Morris,E.J., Hou,S.T., O'Hare,M., Dyson,N., Robertson,G.S., Slack,R.S., and Park,D.S. (2000). E2F1 mediates death of B-amyloid-treated cortical neurons in a manner independent of p53 and dependent on Bax and caspase 3. *J. Biol. Chem.* 275, 11553-11560.

Girling,R., Partridge,J.F., Bandara,L.R., Burden,N., Totty,N.F., Hsuan,J.J., and La Thangue,N.B. (1993). A new component of the transcription factor DRTF1/E2F. *Nature* 362, 83-87.

Goebel, M.G. (1991). The bmi-1 and mel-18 gene products define a new family of DNA-binding proteins involved in cell proliferation and tumorigenesis. *Cell* 66, 623.

Greer, E.L. and Brunet, A. (2005). FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene* 24, 7410-7425.

Grignani, F., Kinsella, T., Mencarelli, A., Valtieri, M., Riganelli, D., Grignani, F., Lanfrancone, L., Peschle, C., Nolan, G.P., and Pelicci, P.G. (1998). High-efficiency gene transfer and selection of human hematopoietic progenitor cells with a hybrid EBV/retroviral vector expressing the green fluorescence protein. *Cancer Res.* 58, 14-19.

Guo, W.J., Datta, S., Band, V., and Dimri, G.P. (2007a). Mel-18, a polycomb group protein, regulates cell proliferation and senescence via transcriptional repression of Bmi-1 and c-Myc oncoproteins. *Mol. Biol. Cell* 18, 536-546.

Guo, W.J., Zeng, M.S., Yadav, A., Song, L.B., Guo, B.H., Band, V., and Dimri, G.P. (2007b). Mel-18 acts as a tumor suppressor by repressing Bmi-1 expression and down-regulating Akt activity in breast cancer cells. *Cancer Res.* 67, 5083-5089.

Hahn, W.C., Counter, C.M., Lundberg, A.S., Beijersbergen, R.L., Brooks, M.W., and Weinberg, R.A. (1999). Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* 400, 464-468.

Hallstrom, T.C. and Nevins, J.R. (2003). Specificity in the activation and control of transcription factor E2F-dependent apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 10848-10853.

Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.

Hannon, G.J. (2002). RNA interference. *Nature* 418, 244-251.

Hannon, G.J., Demetrick, D., and Beach, D. (1993). Isolation of the Rb-related p130 through its interaction with CDK2 and cyclins. *Genes Dev.* 7, 2378-2391.

Haupt, Y., Alexander, W.S., Barri, G., Klinken, S.P., and Adams, J.M. (1991). Novel zinc finger gene implicated as myc collaborator by retrovirally accelerated lymphomagenesis in E mu-myc transgenic mice. *Cell* 65, 753-763.

Henglein, B., Chenivresse, X., Wang, J., Eick, D., and Brechot, C. (1994). Structure and cell cycle-regulated transcription of the human cyclin A gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 5490-5494.

Hernandez-Munoz, I., Lund, A.H., van der, S.P., Boutsma, E., Muijers, I., Verhoeven, E., Nusinow, D.A., Panning, B., Marahrens, Y., and van Lohuizen, M. (2005). From the Cover: Stable X chromosome inactivation involves the PRC1 Polycomb complex and requires histone MACROH2A1 and the CULLIN3/SPOP ubiquitin E3 ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 7635-7640.

Hershko, T. and Ginsberg, D. (2004). Up-regulation of Bcl-2 homology 3 (BH3)-only proteins by E2F1 mediates apoptosis. *J. Biol. Chem.* 279, 8627-8634.

- Hiebert,S.W., Chellappan,S.P., Horowitz,J.M., and Nevins,J.R. (1992). The interaction of RB with E2F coincides with an inhibition of the transcriptional activity of E2F. *Genes Dev.* *6*, 177-185.
- Hijmans,E.M., Voorhoeve,P.M., Beijersbergen,R.L., 't Veer,L.J., and Bernards,R. (1995). E2F-5, a new E2F family member that interacts with p130 in vivo. *Mol. Cell Biol.* *15*, 3082-3089.
- Holmberg,C., Helin,K., Sehested,M., and Karlstrom,O. (1998). E2F-1-induced p53-independent apoptosis in transgenic mice. *Oncogene* *17*, 143-155.
- Hosaka,T., Biggs,W.H., III, Tieu,D., Boyer,A.D., Varki,N.M., Cavenee,W.K., and Arden,K.C. (2004). Disruption of forkhead transcription factor (FOXO) family members in mice reveals their functional diversification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *101*, 2975-2980.
- Huang,H., Regan,K.M., Lou,Z., Chen,J., and Tindall,D.J. (2006). CDK2-dependent phosphorylation of FOXO1 as an apoptotic response to DNA damage. *Science* *314*, 294-297.
- Huang,H., Regan,K.M., Wang,F., Wang,D., Smith,D.I., van Deursen,J.M., and Tindall,D.J. (2005). Skp2 inhibits FOXO1 in tumor suppression through ubiquitin-mediated degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *102*, 1649-1654.
- Humbert,P.O., Rogers,C., Ganiatsas,S., Landsberg,R.L., Trimarchi,J.M., Dandapani,S., Brugnara,C., Erdman,S., Schrenzel,M., Bronson,R.T., and Lees,J.A. (2000). E2F4 is essential for normal erythrocyte maturation and neonatal viability. *Mol. Cell* *6*, 281-291.
- Irwin,M., Marin,M.C., Phillips,A.C., Seelan,R.S., Smith,D.I., Liu,W., Flores,E.R., Tsai,K.Y., Jacks,T., Vousden,K.H., and Kaelin,W.G., Jr. (2000). Role for the p53 homologue p73 in E2F-1-induced apoptosis. *Nature* *407*, 645-648.
- Ishikawa,S. (1977). Differentiation of human neuroblastoma cells in vitro--morphological changes induced by dibutyrl cyclic AMP. *Acta Pathol. Jpn.* *27*, 697-711.
- Itahana,K., Zou,Y., Itahana,Y., Martinez,J.L., Beausejour,C., Jacobs,J.J., van Lohuizen,M., Band,V., Campisi,J., and Dimri,G.P. (2003). Control of the replicative life span of human fibroblasts by p16 and the polycomb protein Bmi-1. *Mol. Cell Biol.* *23*, 389-401.
- Ivey-Hoyle,M., Conroy,R., Huber,H.E., Goodhart,P.J., Oliff,A., and Heimbroom,D.C. (1993). Cloning and characterization of E2F-2, a novel protein with the biochemical properties of transcription factor E2F. *Mol. Cell Biol.* *13*, 7802-7812.
- Iwama,A., Oguro,H., Negishi,M., Kato,Y., Morita,Y., Tsukui,H., Ema,H., Kamijo,T., Katoh-Fukui,Y., Koseki,H., van Lohuizen,M., and Nakauchi,H. (2004). Enhanced self-renewal of hematopoietic stem cells mediated by the polycomb gene product Bmi-1. *Immunity* *21*, 843-851.
- Iwanaga,R., Komori,H., Ishida,S., Okamura,N., Nakayama,K., Nakayama,K.I., and Ohtani,K. (2006). Identification of novel E2F1 target genes regulated in cell cycle-dependent and independent manners. *Oncogene* *25*, 1786-1798.

- Jacobs,F.M., van der Heide,L.P., Wijchers,P.J., Burbach,J.P., Hoekman,M.F., and Smidt,M.P. (2003). FoxO6, a novel member of the FoxO class of transcription factors with distinct shuttling dynamics. *J. Biol. Chem.* 278, 35959-35967.
- Jacobs,J.J., Kieboom,K., Marino,S., DePinho,R.A., and van Lohuizen,M. (1999a). The oncogene and Polycomb-group gene *bmi-1* regulates cell proliferation and senescence through the *ink4a* locus. *Nature* 397, 164-168.
- Jacobs,J.J., Scheijen,B., Voncken,J.W., Kieboom,K., Berns,A., and van Lohuizen,M. (1999b). *Bmi-1* collaborates with c-Myc in tumorigenesis by inhibiting c-Myc-induced apoptosis via INK4a/ARF. *Genes Dev.* 13, 2678-2690.
- Jacobs,J.J. and van Lohuizen,M. (2002). Polycomb repression: from cellular memory to cellular proliferation and cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1602, 151-161.
- Johnson,D.G., Cress,W.D., Jakoi,L., and Nevins,J.R. (1994). Oncogenic capacity of the E2F1 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 12823-12827.
- Kaestner,K.H., Knochel,W., and Martinez,D.E. (2000). Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. *Genes Dev.* 14, 142-146.
- Kang,M.K., Kim,R.H., Kim,S.J., Yip,F.K., Shin,K.H., Dimri,G.P., Christensen,R., Han,T., and Park,N.H. (2007). Elevated *Bmi-1* expression is associated with dysplastic cell transformation during oral carcinogenesis and is required for cancer cell replication and survival. *Br. J. Cancer* 96, 126-133.
- Kanno,M., Hasegawa,M., Ishida,A., Isono,K., and Taniguchi,M. (1995). *mel-18*, a Polycomb group-related mammalian gene, encodes a transcriptional negative regulator with tumor suppressive activity. *EMBO J.* 14, 5672-5678.
- Kenyon,C., Chang,J., Gensch,E., Rudner,A., and Tabtiang,R. (1993). A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature* 366, 461-464.
- Kim,Y., Seger,R., Suresh Babu,C.V., Hwang,S.Y., and Yoo,Y.S. (2004). A positive role of the PI3-K/Akt signaling pathway in PC12 cell differentiation. *Mol. Cells* 18, 353-359.
- Kirmizis,A., Bartley,S.M., and Farnham,P.J. (2003). Identification of the polycomb group protein SU(Z)12 as a potential molecular target for human cancer therapy. *Mol. Cancer Ther.* 2, 113-121.
- Kitagawa,M., Higashi,H., Suzuki-Takahashi,I., Segawa,K., Hanks,S.K., Taya,Y., Nishimura,S., and Okuyama,A. (1995). Phosphorylation of E2F-1 by cyclin A-cdk2. *Oncogene* 10, 229-236.
- Knudson,A.G., Jr. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 68, 820-823.
- Kobayashi,Y., Furukawa-Hibi,Y., Chen,C., Horio,Y., Isobe,K., Ikeda,K., and Motoyama,N. (2005). SIRT1 is critical regulator of FOXO-mediated transcription in response to oxidative stress. *Int. J. Mol. Med.* 16, 237-243.

- Komori,H., Enomoto,M., Nakamura,M., Iwanaga,R., and Ohtani,K. (2005). Distinct E2F-mediated transcriptional program regulates p14ARF gene expression. *EMBO J.* 24, 3724-3736.
- Koolman,J. and Roehm,K.-H. (2003). Taschenatlas der Biochemie. (Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag).
- Kops,G.J., Dansen,T.B., Polderman,P.E., Saarloos,I., Wirtz,K.W., Coffey,P.J., Huang,T.T., Bos,J.L., Medema,R.H., and Burgering,B.M. (2002a). Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. *Nature* 419, 316-321.
- Kops,G.J., de Ruiter,N.D., Vries-Smits,A.M., Powell,D.R., Bos,J.L., and Burgering,B.M. (1999). Direct control of the Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B. *Nature* 398, 630-634.
- Kops,G.J., Medema,R.H., Glassford,J., Essers,M.A., Dijkers,P.F., Coffey,P.J., Lam,E.W., and Burgering,B.M. (2002b). Control of cell cycle exit and entry by protein kinase B-regulated forkhead transcription factors. *Mol. Cell Biol.* 22, 2025-2036.
- Korenjak,M., Taylor-Harding,B., Binne,U.K., Satterlee,J.S., Stevaux,O., Aasland,R., White-Cooper,H., Dyson,N., and Brehm,A. (2004). Native E2F/RBF complexes contain Myb-interacting proteins and repress transcription of developmentally controlled E2F target genes. *Cell* 119, 181-193.
- Kovesdi,I., Reichel,R., and Nevins,J.R. (1986). E1A transcription induction: enhanced binding of a factor to upstream promoter sequences. *Science* 231, 719-722.
- Kovesdi,I., Reichel,R., and Nevins,J.R. (1987). Role of an adenovirus E2 promoter binding factor in E1A-mediated coordinate gene control. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 84, 2180-2184.
- Krek,W., Ewen,M.E., Shirodkar,S., Arany,Z., Kaelin,W.G., Jr., and Livingston,D.M. (1994). Negative regulation of the growth-promoting transcription factor E2F-1 by a stably bound cyclin A-dependent protein kinase. *Cell* 78, 161-172.
- Krek,W., Livingston,D.M., and Shirodkar,S. (1993). Binding to DNA and the retinoblastoma gene product promoted by complex formation of different E2F family members. *Science* 262, 1557-1560.
- Kulozik,A.E., Hentze,M.W., Hagemeier,C., and Bartram,C.R. (2000). Molekulare Medizin - Grundlagen, Pathomechanismen, Klinik. (Berlin, New York: Walter de Gruyter Verlag).
- Kyoung,K.H., Kyoung,K.Y., Song,I.H., Baek,S.H., Lee,S.R., Hye,K.J., and Kim,J.R. (2005). Down-regulation of a forkhead transcription factor, FOXO3a, accelerates cellular senescence in human dermal fibroblasts. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 60, 4-9.
- Laemmli,U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

- Lazzerini,D.E. and Helin,K. (2005). E2F1 is crucial for E2F-dependent apoptosis. *EMBO Rep.* 6, 661-668.
- Lee,W.H., Bookstein,R., Hong,F., Young,L.J., Shew,J.Y., and Lee,E.Y. (1987). Human retinoblastoma susceptibility gene: cloning, identification, and sequence. *Science* 235, 1394-1399.
- Lees,J.A., Saito,M., Vidal,M., Valentine,M., Look,T., Harlow,E., Dyson,N., and Helin,K. (1993). The retinoblastoma protein binds to a family of E2F transcription factors. *Mol. Cell Biol.* 13, 7813-7825.
- Leone,G., Nuckolls,F., Ishida,S., Adams,M., Sears,R., Jakoi,L., Miron,A., and Nevins,J.R. (2000). Identification of a novel E2F3 product suggests a mechanism for determining specificity of repression by Rb proteins. *Mol. Cell Biol.* 20, 3626-3632.
- Lessard,J. and Sauvageau,G. (2003). Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells. *Nature* 423, 255-260.
- Leung,C., Lingbeek,M., Shakhova,O., Liu,J., Tanger,E., Saremaslani,P., van Lohuizen,M., and Marino,S. (2004). Bmi 1 is essential for cerebellar development and is overexpressed in human medulloblastomas. *Nature* 428, 337-341.
- Lin,K., Dorman,J.B., Rodan,A., and Kenyon,C. (1997). daf-16: An HNF-3/forkhead family member that can function to double the life-span of *Caenorhabditis elegans*. *Science* 278, 1319-1322.
- Lindeman,G.J., Dagnino,L., Gaubatz,S., Xu,Y., Bronson,R.T., Warren,H.B., and Livingston,D.M. (1998). A specific, nonproliferative role for E2F-5 in choroid plexus function revealed by gene targeting. *Genes Dev.* 12, 1092-1098.
- Lindstrom,M.S. and Wiman,K.G. (2003). Myc and E2F1 induce p53 through p14ARF-independent mechanisms in human fibroblasts. *Oncogene* 22, 4993-5005.
- Littlewood,T.D., Hancock,D.C., Danielian,P.S., Parker,M.G., and Evan,G.I. (1995). A modified oestrogen receptor ligand-binding domain as an improved switch for the regulation of heterologous proteins. *Nucleic Acids Res.* 23, 1686-1690.
- Liu,D.X. and Greene,L.A. (2001). Regulation of neuronal survival and death by E2F-dependent gene repression and derepression. *Neuron* 32, 425-438.
- Liu,L., Andrews,L.G., and Tollefsbol,T.O. (2006a). Loss of the human polycomb group protein BMI1 promotes cancer-specific cell death. *Oncogene* 25, 4370-4375.
- Liu,S., Dontu,G., Mantle,I.D., Patel,S., Ahn,N.S., Jackson,K.W., Suri,P., and Wicha,M.S. (2006b). Hedgehog signaling and Bmi-1 regulate self-renewal of normal and malignant human mammary stem cells. *Cancer Res.* 66, 6063-6071.
- Logan,N., Delavaine,L., Graham,A., Reilly,C., Wilson,J., Brummelkamp,T.R., Hijmans,E.M., Bernards,R., and La Thangue,N.B. (2004). E2F-7: a distinctive E2F family member with an unusual organization of DNA-binding domains. *Oncogene* 23, 5138-5150.



- Logan,N., Graham,A., Zhao,X., Fisher,R., Maiti,B., Leone,G., and La Thangue,N.B. (2005). E2F-8: an E2F family member with a similar organization of DNA-binding domains to E2F-7. *Oncogene* 24, 5000-5004.
- Lyons,T.E., Salih,M., and Tuana,B.S. (2006). Activating E2Fs mediate transcriptional regulation of human E2F6 repressor. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 290, C189-C199.
- Maehara,K., Yamakoshi,K., Ohtani,N., Kubo,Y., Takahashi,A., Arase,S., Jones,N., and Hara,E. (2005). Reduction of total E2F/DP activity induces senescence-like cell cycle arrest in cancer cells lacking functional pRB and p53. *J. Cell Biol.* 168, 553-560.
- Mahmud,D.L., Amlak,M., Deb,D.K., Platanias,L.C., Uddin,S., and Wickrema,A. (2002). Phosphorylation of forkhead transcription factors by erythropoietin and stem cell factor prevents acetylation and their interaction with coactivator p300 in erythroid progenitor cells. *Oncogene* 21, 1556-1562.
- Mak,W., Baxter,J., Silva,J., Newall,A.E., Otte,A.P., and Brockdorff,N. (2002). Mitotically stable association of polycomb group proteins eed and enx1 with the inactive x chromosome in trophoblast stem cells. *Curr. Biol.* 12, 1016-1020.
- Marker,P.C. (2007). Essential role for activation of the Polycomb group (PcG) protein chromatin silencing pathway in metastatic prostate cancer Berezovska OP, Glinskii AB, Yang Z, Li XM, Hoffman RM, Glinsky GV, Translational and Functional Genomics Laboratory, Ordway Cancer Center, Ordway Research Institute, Inc., Center for Medical Sciences, Albany, NY. *Urol. Oncol.* 25, 278-279.
- Martins,C.P., Brown-Swigart,L., and Evan,G.I. (2006). Modeling the therapeutic efficacy of p53 restoration in tumors. *Cell* 127, 1323-1334.
- Matsuzaki,H., Daitoku,H., Hatta,M., Tanaka,K., and Fukamizu,A. (2003). Insulin-induced phosphorylation of FKHR (Foxo1) targets to proteasomal degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 11285-11290.
- McCann,J.J., Hebert,L.E., Bennett,D.A., Skul,V.V., and Evans,D.A. (1997). Why Alzheimer's disease is a women's health issue. *J. Am. Med. Womens Assoc.* 52, 132-137.
- Medema,R.H., Kops,G.J., Bos,J.L., and Burgering,B.M. (2000). AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. *Nature* 404, 782-787.
- Mello,C.C. and Conte,D., Jr. (2004). Revealing the world of RNA interference. *Nature* 431, 338-342.
- Milton,A., Luoto,K., Ingram,L., Munro,S., Logan,N., Graham,A.L., Brummelkamp,T.R., Hijmans,E.M., Bernards,R., and La Thangue,N.B. (2006). A functionally distinct member of the DP family of E2F subunits. *Oncogene* 25, 3212-3218.
- Moberg,K., Starz,M.A., and Lees,J.A. (1996). E2F-4 switches from p130 to p107 and pRB in response to cell cycle reentry. *Mol. Cell Biol.* 16, 1436-1449.

Modur,V., Nagarajan,R., Evers,B.M., and Milbrandt,J. (2002). FOXO proteins regulate tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand expression. Implications for PTEN mutation in prostate cancer. *J. Biol. Chem.* 277, 47928-47937.

Molofsky,A.V., He,S., Bydon,M., Morrison,S.J., and Pardal,R. (2005). Bmi-1 promotes neural stem cell self-renewal and neural development but not mouse growth and survival by repressing the p16Ink4a and p19Arf senescence pathways. *Genes Dev.* 19, 1432-1437.

Molofsky,A.V., Pardal,R., Iwashita,T., Park,I.K., Clarke,M.F., and Morrison,S.J. (2003). Bmi-1 dependence distinguishes neural stem cell self-renewal from progenitor proliferation. *Nature* 425, 962-967.

Morgenstern,J.P. and Land,H. (1990). Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line. *Nucleic Acids Res.* 18, 3587-3596.

Moroni,M.C., Hickman,E.S., Denchi,E.L., Caprara,G., Colli,E., Cecconi,F., Muller,H., and Helin,K. (2001). Apaf-1 is a transcriptional target for E2F and p53. *Nat. Cell Biol.* 3, 552-558.

Morris,J.Z., Tissenbaum,H.A., and Ruvkun,G. (1996). A phosphatidylinositol-3-OH kinase family member regulating longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 382, 536-539.

Motta,M.C., Divecha,N., Lemieux,M., Kamel,C., Chen,D., Gu,W., Bultsma,Y., McBurney,M., and Guarente,L. (2004). Mammalian SIRT1 represses forkhead transcription factors. *Cell* 116, 551-563.

Muller,H., Bracken,A.P., Vernell,R., Moroni,M.C., Christians,F., Grassilli,E., Prosperini,E., Vigo,E., Oliner,J.D., and Helin,K. (2001). E2Fs regulate the expression of genes involved in differentiation, development, proliferation, and apoptosis. *Genes Dev.* 15, 267-285.

Nakae,J., Kitamura,T., Silver,D.L., and Accili,D. (2001). The forkhead transcription factor Foxo1 (Fkhr) confers insulin sensitivity onto glucose-6-phosphatase expression. *J. Clin. Invest* 108, 1359-1367.

Nakamura,N., Ramaswamy,S., Vazquez,F., Signoretti,S., Loda,M., and Sellers,W.R. (2000). Forkhead transcription factors are critical effectors of cell death and cell cycle arrest downstream of PTEN. *Mol. Cell Biol.* 20, 8969-8982.

Narita,M., Nunez,S., Heard,E., Narita,M., Lin,A.W., Hearn,S.A., Spector,D.L., Hannon,G.J., and Lowe,S.W. (2003). Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* 113, 703-716.

Nowak,K., Killmer,K., Gessner,C., and Lutz,W. (2007). E2F-1 regulates expression of FOXO1 and FOXO3a. *Biochim. Biophys. Acta* 1769, 244-252.

Ogg,S., Paradis,S., Gottlieb,S., Patterson,G.I., Lee,L., Tissenbaum,H.A., and Ruvkun,G. (1997). The Fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans*. *Nature* 389, 994-999.

- Ohtani,K., DeGregori,J., and Nevins,J.R. (1995). Regulation of the cyclin E gene by transcription factor E2F1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 12146-12150.
- Ohtani,K., Tsujimoto,A., Ikeda,M., and Nakamura,M. (1998). Regulation of cell growth-dependent expression of mammalian CDC6 gene by the cell cycle transcription factor E2F. *Oncogene* 17, 1777-1785.
- Paik,J.H., Kollipara,R., Chu,G., Ji,H., Xiao,Y., Ding,Z., Miao,L., Tothova,Z., Horner,J.W., Carrasco,D.R., Jiang,S., Gilliland,D.G., Chin,L., Wong,W.H., Castrillon,D.H., and DePinho,R.A. (2007). FoxOs Are Lineage-Restricted Redundant Tumor Suppressors and Regulate Endothelial Cell Homeostasis. *Cell* 128, 309-323.
- Park,I.K., Qian,D., Kiel,M., Becker,M.W., Pihalja,M., Weissman,I.L., Morrison,S.J., and Clarke,M.F. (2003). Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells. *Nature* 423, 302-305.
- Paro,R. (1995). Propagating memory of transcriptional states. *Trends Genet.* 11, 295-297.
- Parry,P., Wei,Y., and Evans,G. (1994). Cloning and characterization of the t(X;11) breakpoint from a leukemic cell line identify a new member of the forkhead gene family. *Genes Chromosomes. Cancer* 11, 79-84.
- Payne,S.R. and Kemp,C.J. (2005). Tumor suppressor genetics. *Carcinogenesis* 26, 2031-2045.
- Pear,W.S., Nolan,G.P., Scott,M.L., and Baltimore,D. (1993). Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 8392-8396.
- Persengiev,S.P., Kondova,I.I., and Kilpatrick,D.L. (1999). E2F4 actively promotes the initiation and maintenance of nerve growth factor-induced cell differentiation. *Mol. Cell Biol.* 19, 6048-6056.
- Phillips,A.C., Bates,S., Ryan,K.M., Helin,K., and Vousden,K.H. (1997). Induction of DNA synthesis and apoptosis are separable functions of E2F-1. *Genes Dev.* 11, 1853-1863.
- Phillips,A.C., Ernst,M.K., Bates,S., Rice,N.R., and Vousden,K.H. (1999). E2F-1 potentiates cell death by blocking antiapoptotic signaling pathways. *Mol. Cell* 4, 771-781.
- Piatti,S., Bohm,T., Cocker,J.H., Diffley,J.F., and Nasmyth,K. (1996). Activation of S-phase-promoting CDKs in late G1 defines a "point of no return" after which Cdc6 synthesis cannot promote DNA replication in yeast. *Genes Dev.* 10, 1516-1531.
- Pierce,A.M., Gimenez-Conti,I.B., Schneider-Broussard,R., Martinez,L.A., Conti,C.J., and Johnson,D.G. (1998). Increased E2F1 activity induces skin tumors in mice heterozygous and nullizygous for p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 8858-8863.

- Pittman,R.N., Wang,S., DiBenedetto,A.J., and Mills,J.C. (1993). A system for characterizing cellular and molecular events in programmed neuronal cell death. *J. Neurosci.* *13*, 3669-3680.
- Plas,D.R. and Thompson,C.B. (2003). Akt activation promotes degradation of tuberin and FOXO3a via the proteasome. *J. Biol. Chem.* *278*, 12361-12366.
- Prince,M.E., Sivanandan,R., Kaczorowski,A., Wolf,G.T., Kaplan,M.J., Dalerba,P., Weissman,I.L., Clarke,M.F., and Ailles,L.E. (2007). Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *104*, 973-978.
- Ramaswamy,S., Nakamura,N., Sansal,I., Bergeron,L., and Sellers,W.R. (2002). A novel mechanism of gene regulation and tumor suppression by the transcription factor FKHR. *Cancer Cell* *2*, 81-91.
- Rayman,J.B., Takahashi,Y., Indjeian,V.B., Dannenberg,J.H., Catchpole,S., Watson,R.J., te,R.H., and Dynlacht,B.D. (2002). E2F mediates cell cycle-dependent transcriptional repression in vivo by recruitment of an HDAC1/mSin3B corepressor complex. *Genes Dev.* *16*, 933-947.
- Reinisch,C., Kandutsch,S., Uthman,A., and Pammer,J. (2006). BMI-1: a protein expressed in stem cells, specialized cells and tumors of the gastrointestinal tract. *Histol. Histopathol.* *21*, 1143-1149.
- Reis,R.M., Konu-Lebleblicioglu,D., Lopes,J.M., Kleihues,P., and Ohgaki,H. (2000). Genetic profile of gliosarcomas. *Am. J. Pathol.* *156*, 425-432.
- Rempel,R.E., Saenz-Robles,M.T., Storms,R., Morham,S., Ishida,S., Engel,A., Jakoi,L., Melhem,M.F., Pipas,J.M., Smith,C., and Nevins,J.R. (2000). Loss of E2F4 activity leads to abnormal development of multiple cellular lineages. *Mol. Cell* *6*, 293-306.
- Rena,G., Guo,S., Cichy,S.C., Unterman,T.G., and Cohen,P. (1999). Phosphorylation of the transcription factor forkhead family member FKHR by protein kinase B. *J. Biol. Chem.* *274*, 17179-17183.
- Robertson,K.D., Ait-Si-Ali,S., Yokochi,T., Wade,P.A., Jones,P.L., and Wolffe,A.P. (2000). DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters. *Nat. Genet.* *25*, 338-342.
- Rogers,S., Wells,R., and Rechsteiner,M. (1986). Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* *234*, 364-368.
- Ross,R.A., Spengler,B.A., Domenech,C., Porubcin,M., Rettig,W.J., and Biedler,J.L. (1995). Human neuroblastoma I-type cells are malignant neural crest stem cells. *Cell Growth Differ.* *6*, 449-456.
- Rowland,B.D. and Bernards,R. (2006). Re-evaluating cell-cycle regulation by E2Fs. *Cell* *127*, 871-874.

- Rowland,B.D., Denissov,S.G., Douma,S., Stunnenberg,H.G., Bernards,R., and Peeper,D.S. (2002). E2F transcriptional repressor complexes are critical downstream targets of p19(ARF)/p53-induced proliferative arrest. *Cancer Cell* 2, 55-65.
- Russell,J.L., Powers,J.T., Rounbehler,R.J., Rogers,P.M., Conti,C.J., and Johnson,D.G. (2002). ARF differentially modulates apoptosis induced by E2F1 and Myc. *Mol. Cell Biol.* 22, 1360-1368.
- Sanchez-Beato,M., Sanchez,E., Gonzalez-Carrero,J., Morente,M., Diez,A., Sanchez-Verde,L., Martin,M.C., Cigudosa,J.C., Vidal,M., and Piris,M.A. (2006). Variability in the expression of polycomb proteins in different normal and tumoral tissues. A pilot study using tissue microarrays. *Mod. Pathol.* 19, 684-694.
- Satijn,D.P. and Otte,A.P. (1999). RING1 interacts with multiple Polycomb-group proteins and displays tumorigenic activity. *Mol. Cell Biol.* 19, 57-68.
- Sato,T. and Denell,R.E. (1985). Homoeosis in *Drosophila*: anterior and posterior transformations of Polycomb lethal embryos. *Dev. Biol.* 110, 53-64.
- Sawa,M., Yamamoto,K., Yokozawa,T., Kiyoi,H., Hishida,A., Kajiguchi,T., Seto,M., Kohno,A., Kitamura,K., Itoh,Y., Asou,N., Hamajima,N., Emi,N., and Naoe,T. (2005). BMI-1 is highly expressed in M0-subtype acute myeloid leukemia. *Int. J. Hematol.* 82, 42-47.
- Schmidt,M., Fernandez,d.M., van der,H.A., Klompmaker,R., Kops,G.J., Lam,E.W., Burgering,B.M., and Medema,R.H. (2002). Cell cycle inhibition by FoxO forkhead transcription factors involves downregulation of cyclin D. *Mol. Cell Biol.* 22, 7842-7852.
- Schmoll,D., Walker,K.S., Alessi,D.R., Grempler,R., Burchell,A., Guo,S., Walther,R., and Unterman,T.G. (2000). Regulation of glucose-6-phosphatase gene expression by protein kinase Balpha and the forkhead transcription factor FKHR. Evidence for insulin response unit-dependent and -independent effects of insulin on promoter activity. *J. Biol. Chem.* 275, 36324-36333.
- Schwab,M. (2004). MYCN in neuronal tumours. *Cancer Lett.* 204, 179-187.
- Schwartz,Y.B., Kahn,T.G., Nix,D.A., Li,X.Y., Bourgon,R., Biggin,M., and Pirrotta,V. (2006). Genome-wide analysis of Polycomb targets in *Drosophila melanogaster*. *Nat. Genet.* 38, 700-705.
- Seeger,R.C., Brodeur,G.M., Sather,H., Dalton,A., Siegel,S.E., Wong,K.Y., and Hammond,D. (1985). Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *N. Engl. J. Med.* 313, 1111-1116.
- Shapiro,D.N., Sublett,J.E., Li,B., Downing,J.R., and Naeve,C.W. (1993). Fusion of PAX3 to a member of the forkhead family of transcription factors in human alveolar rhabdomyosarcoma. *Cancer Res.* 53, 5108-5112.
- Shivji,M.K. and La Thangue,N.B. (1991). Multicomponent differentiation-regulated transcription factors in F9 embryonal carcinoma stem cells. *Mol. Cell Biol.* 11, 1686-1695.

- So,C.W. and Cleary,M.L. (2002). MLL-AFX requires the transcriptional effector domains of AFX to transform myeloid progenitors and transdominantly interfere with forkhead protein function. *Mol. Cell Biol.* 22, 6542-6552.
- So,C.W. and Cleary,M.L. (2003). Common mechanism for oncogenic activation of MLL by forkhead family proteins. *Blood* 101, 633-639.
- Storre,J., Elsasser,H.P., Fuchs,M., Ullmann,D., Livingston,D.M., and Gaubatz,S. (2002). Homeotic transformations of the axial skeleton that accompany a targeted deletion of E2f6. *EMBO Rep.* 3, 695-700.
- Strieder,V. and Lutz,W. (2003). E2F proteins regulate MYCN expression in neuroblastomas. *J. Biol. Chem.* 278, 2983-2989.
- Sunters,A., Fernandez,d.M., Stahl,M., Brosens,J.J., Zoumpoulidou,G., Saunders,C.A., Coffey,P.J., Medema,R.H., Coombes,R.C., and Lam,E.W. (2003). FoxO3a transcriptional regulation of Bim controls apoptosis in paclitaxel-treated breast cancer cell lines. *J. Biol. Chem.* 278, 49795-49805.
- Suzuki,A. and Hemmati-Brivanlou,A. (2000). Xenopus embryonic E2F is required for the formation of ventral and posterior cell fates during early embryogenesis. *Mol. Cell* 5, 217-229.
- Tagawa,M., Sakamoto,T., Shigemoto,K., Matsubara,H., Tamura,Y., Ito,T., Nakamura,I., Okitsu,A., Imai,K., and Taniguchi,M. (1990). Expression of novel DNA-binding protein with zinc finger structure in various tumor cells. *J. Biol. Chem.* 265, 20021-20026.
- Takahashi,Y., Rayman,J.B., and Dynlacht,B.D. (2000). Analysis of promoter binding by the E2F and pRB families in vivo: distinct E2F proteins mediate activation and repression. *Genes Dev.* 14, 804-816.
- Tateishi,K., Ohta,M., Kanai,F., Guleng,B., Tanaka,Y., Asaoka,Y., Tada,M., Seto,M., Jazag,A., Lianjie,L., Okamoto,M., Isayama,H., Tada,M., Yoshida,H., Kawabe,T., and Omata,M. (2006). Dysregulated expression of stem cell factor Bmi1 in precancerous lesions of the gastrointestinal tract. *Clin. Cancer Res.* 12, 6960-6966.
- Tetsu,O., Ishihara,H., Kanno,R., Kamiyasu,M., Inoue,H., Tokuhisa,T., Taniguchi,M., and Kanno,M. (1998). mel-18 negatively regulates cell cycle progression upon B cell antigen receptor stimulation through a cascade leading to c-myc/cdc25. *Immunity.* 9, 439-448.
- Tolbert,D., Lu,X., Yin,C., Tantama,M., and Van Dyke,T. (2002). p19(ARF) is dispensable for oncogenic stress-induced p53-mediated apoptosis and tumor suppression in vivo. *Mol. Cell Biol.* 22, 370-377.
- Tothova,Z., Kollipara,R., Huntly,B.J., Lee,B.H., Castrillon,D.H., Cullen,D.E., McDowell,E.P., Lazo-Kallanian,S., Williams,I.R., Sears,C., Armstrong,S.A., Passegue,E., DePinho,R.A., and Gilliland,D.G. (2007). FoxOs Are Critical Mediators of Hematopoietic Stem Cell Resistance to Physiologic Oxidative Stress. *Cell* 128, 325-339.

- Tran,H., Brunet,A., Grenier,J.M., Datta,S.R., Fornace,A.J., Jr., DiStefano,P.S., Chiang,L.W., and Greenberg,M.E. (2002). DNA repair pathway stimulated by the forkhead transcription factor FOXO3a through the Gadd45 protein. *Science* 296, 530-534.
- Trimarchi,J.M. and Lees,J.A. (2002). Sibling rivalry in the E2F family. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 11-20.
- Tsai,K.Y., MacPherson,D., Robinson,D.A., Crowley,D., and Jacks,T. (2002). ARF is not required for apoptosis in Rb mutant mouse embryos. *Curr. Biol.* 12, 159-163.
- Tsujimoto,Y., Yunis,J., Onorato-Showe,L., Erikson,J., Nowell,P.C., and Croce,C.M. (1984). Molecular cloning of the chromosomal breakpoint of B-cell lymphomas and leukemias with the t(11;14) chromosome translocation. *Science* 224, 1403-1406.
- Vairo,G., Livingston,D.M., and Ginsberg,D. (1995). Functional interaction between E2F-4 and p130: evidence for distinct mechanisms underlying growth suppression by different retinoblastoma protein family members. *Genes Dev.* 9, 869-881.
- van de Wetering,M., Oving,I., Muncan,V., Pon Fong,M.T., Brantjes,H., van Leenen,D., Holstege,F.C., Brummelkamp,T.R., Agami,R., and Clevers,H. (2003). Specific inhibition of gene expression using a stably integrated, inducible small-interfering-RNA vector. *EMBO Rep.* 4, 609-615.
- van den Heuvel,A.P., Schulze,A., and Burgering,B.M. (2005). Direct control of caveolin-1 expression by FOXO transcription factors. *Biochem. J.* 385, 795-802.
- van der Heide,L.P., Hoekman,M.F., and Smidt,M.P. (2004). The ins and outs of FoxO shuttling: mechanisms of FoxO translocation and transcriptional regulation. *Biochem. J.* 380, 297-309.
- van der Heide,L.P. and Smidt,M.P. (2005). Regulation of FoxO activity by CBP/p300-mediated acetylation. *Trends Biochem. Sci.* 30, 81-86.
- van der Lugt,N.M., Alkema,M., Berns,A., and Deschamps,J. (1996). The Polycomb-group homolog Bmi-1 is a regulator of murine Hox gene expression. *Mech. Dev.* 58, 153-164.
- van der Lugt,N.M., Domen,J., Linders,K., van Roon,M., Robanus-Maandag,E., te,R.H., van,d., V, Deschamps,J., Sofroniew,M., and van Lohuizen,M. (1994). Posterior transformation, neurological abnormalities, and severe hematopoietic defects in mice with a targeted deletion of the bmi-1 proto-oncogene. *Genes Dev.* 8, 757-769.
- van der Horst,A., Tertoolen,L.G., Vries-Smits,L.M., Frye,R.A., Medema,R.H., and Burgering,B.M. (2004). FOXO4 is acetylated upon peroxide stress and deacetylated by the longevity protein hSir2(SIRT1). *J. Biol. Chem.* 279, 28873-28879.
- van der Horst,A., Vries-Smits,A.M., Brenkman,A.B., van Triest,M.H., van den,B.N., Colland,F., Maurice,M.M., and Burgering,B.M. (2006a). FOXO4 transcriptional activity is regulated by monoubiquitination and USP7/HAUSP. *Nat. Cell Biol.* 8, 1064-1073.

van der Horst,A., Vries-Smits,A.M., Brenkman,A.B., van Triest,M.H., van den,B.N., Colland,F., Maurice,M.M., and Burgering,B.M. (2006b). FOXO4 transcriptional activity is regulated by monoubiquitination and USP7/HAUSP. *Nat. Cell Biol.* 8, 1064-1073.

van Galen,J.C., Muris,J.J., Oudejans,J.J., Vos,W., Giroth,C.P., Ossenkoppele,G.J., Otte,A.P., Raaphorst,F.M., and Meijer,C.J. (2007). Expression of the polycomb-group gene BMI1 is related to an unfavourable prognosis in primary nodal DLBCL. *J. Clin. Pathol.* 60, 167-172.

van Leenders,G.J., Dukers,D., Hessels,D., van den Kieboom,S.W., Hulsbergen,C.A., Witjes,J.A., Otte,A.P., Meijer,C.J., and Raaphorst,F.M. (2006). Polycomb-Group Oncogenes EZH2, BMI1, and RING1 Are Overexpressed in Prostate Cancer With Adverse Pathologic and Clinical Features. *Eur. Urol.*

van Leenders,G.J., Dukers,D., Hessels,D., van den Kieboom,S.W., Hulsbergen,C.A., Witjes,J.A., Otte,A.P., Meijer,C.J., and Raaphorst,F.M. (2007). Polycomb-group oncogenes EZH2, BMI1, and RING1 are overexpressed in prostate cancer with adverse pathologic and clinical features. *Eur. Urol.* 52, 455-463.

van Lohuizen,M., Verbeek,S., Scheijen,B., Wientjens,E., van der,G.H., and Berns,A. (1991). Identification of cooperating oncogenes in E mu-myc transgenic mice by provirus tagging. *Cell* 65, 737-752.

Vandel,L., Nicolas,E., Vaute,O., Ferreira,R., Ait-Si-Ali,S., and Trouche,D. (2001). Transcriptional repression by the retinoblastoma protein through the recruitment of a histone methyltransferase. *Mol. Cell Biol.* 21, 6484-6494.

Venkatachalam,S., Shi,Y.P., Jones,S.N., Vogel,H., Bradley,A., Pinkel,D., and Donehower,L.A. (1998). Retention of wild-type p53 in tumors from p53 heterozygous mice: reduction of p53 dosage can promote cancer formation. *EMBO J.* 17, 4657-4667.

Vigo,E., Muller,H., Prosperini,E., Hateboer,G., Cartwright,P., Moroni,M.C., and Helin,K. (1999). CDC25A phosphatase is a target of E2F and is required for efficient E2F-induced S phase. *Mol. Cell Biol.* 19, 6379-6395.

Vire,E., Brenner,C., Deplus,R., Blanchon,L., Fraga,M., Didelot,C., Morey,L., Van Eynde,A., Bernard,D., Vanderwinden,J.M., Bollen,M., Esteller,M., Di Croce,L., de Launoit,Y., and Fuks,F. (2006). The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature* 439, 871-874.

Voncken,J.W., Niessen,H., Neufeld,B., Rennefahrt,U., Dahlmans,V., Kubben,N., Holzer,B., Ludwig,S., and Rapp,U.R. (2004). MAPKAP kinase 3pK phosphorylates and regulates chromatin-association of the polycomb-group protein Bmi1. *J. Biol. Chem.*

Voncken,J.W., Schweizer,D., Aagaard,L., Sattler,L., Jantsch,M.F., and van Lohuizen,M. (1999). Chromatin-association of the Polycomb group protein BMI1 is cell cycle-regulated and correlates with its phosphorylation status. *J. Cell Sci.* 112 ( Pt 24), 4627-4639.



- Wang,H., Wang,L., Erdjument-Bromage,H., Vidal,M., Tempst,P., Jones,R.S., and Zhang,Y. (2004a). Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. *Nature* *431*, 873-878.
- Wang,J., Mager,J., Chen,Y., Schneider,E., Cross,J.C., Nagy,A., and Magnuson,T. (2001). Imprinted X inactivation maintained by a mouse Polycomb group gene. *Nat. Genet.* *28*, 371-375.
- Wang,L., Brown,J.L., Cao,R., Zhang,Y., Kassis,J.A., and Jones,R.S. (2004b). Hierarchical recruitment of polycomb group silencing complexes. *Mol. Cell* *14*, 637-646.
- Wei,J., Zhai,L., Xu,J., and Wang,H. (2006). Role of Bmi1 in H2A ubiquitylation and Hox gene silencing. *J. Biol. Chem.* *281*, 22537-22544.
- Weigel,D., Jurgens,G., Kuttner,F., Seifert,E., and Jackle,H. (1989). The homeotic gene fork head encodes a nuclear protein and is expressed in the terminal regions of the *Drosophila* embryo. *Cell* *57*, 645-658.
- Weikert,S., Christoph,F., Kollermann,J., Muller,M., Schrader,M., Miller,K., and Krause,H. (2005). Expression levels of the EZH2 polycomb transcriptional repressor correlate with aggressiveness and invasive potential of bladder carcinomas. *Int. J. Mol. Med.* *16*, 349-353.
- Wells,J., Boyd,K.E., Fry,C.J., Bartley,S.M., and Farnham,P.J. (2000). Target gene specificity of E2F and pocket protein family members in living cells. *Mol. Cell Biol.* *20*, 5797-5807.
- Wu,L., Timmers,C., Maiti,B., Saavedra,H.I., Sang,L., Chong,G.T., Nuckolls,F., Giangrande,P., Wright,F.A., Field,S.J., Greenberg,M.E., Orkin,S., Nevins,J.R., Robinson,M.L., and Leone,G. (2001). The E2F1-3 transcription factors are essential for cellular proliferation. *Nature* *414*, 457-462.
- Xiao,A., Wu,H., Pandolfi,P.P., Louis,D.N., and Van Dyke,T. (2002). Astrocyte inactivation of the pRb pathway predisposes mice to malignant astrocytoma development that is accelerated by PTEN mutation. *Cancer Cell* *1*, 157-168.
- Xu,M., Sheppard,K.A., Peng,C.Y., Yee,A.S., and Piwnicka-Worms,H. (1994). Cyclin A/CDK2 binds directly to E2F-1 and inhibits the DNA-binding activity of E2F-1/DP-1 by phosphorylation. *Mol. Cell Biol.* *14*, 8420-8431.
- Yamasaki,L., Bronson,R., Williams,B.O., Dyson,N.J., Harlow,E., and Jacks,T. (1998). Loss of E2F-1 reduces tumorigenesis and extends the lifespan of Rb1(+/-)mice. *Nat. Genet.* *18*, 360-364.
- Yamasaki,L., Jacks,T., Bronson,R., Goillot,E., Harlow,E., and Dyson,N.J. (1996). Tumor induction and tissue atrophy in mice lacking E2F-1. *Cell* *85*, 537-548.
- Yanase,S., Yasuda,K., and Ishii,N. (2002). Adaptive responses to oxidative damage in three mutants of *Caenorhabditis elegans* (age-1, mev-1 and daf-16) that affect life span. *Mech. Ageing Dev.* *123*, 1579-1587.

Yeagley,D., Guo,S., Unterman,T., and Quinn,P.G. (2001). Gene- and activation-specific mechanisms for insulin inhibition of basal and glucocorticoid-induced insulin-like growth factor binding protein-1 and phosphoenolpyruvate carboxykinase transcription. Roles of forkhead and insulin response sequences. *J. Biol. Chem.* 276, 33705-33710.

Zhang,H., Pan,K.H., and Cohen,S.N. (2003). Senescence-specific gene expression fingerprints reveal cell-type-dependent physical clustering of up-regulated chromosomal loci. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 3251-3256.

Zhang,H.S., Postigo,A.A., and Dean,D.C. (1999). Active transcriptional repression by the Rb-E2F complex mediates G1 arrest triggered by p16INK4a, TGFbeta, and contact inhibition. *Cell* 97, 53-61.

Zhang,Y. and Chellappan,S.P. (1995). Cloning and characterization of human DP2, a novel dimerization partner of E2F. *Oncogene* 10, 2085-2093.

## 8 ANHANG

### 8.1 Abkürzungen

°C	Grad Celsius
μ	mikro
4-OHT	4-Hydroxytamoxifen
abs.	absolut (100%)
AML	acute myeloid leukemia
APAF-1	apoptosis protease-activating factor 1
APS	Ammoniumperoxodisulfat
aqua bidest.	zweifach destilliertes Wasser
ARF	alternative reading frame
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
β-Gal	β-Galaktosidase
Bim	Bcl-2-interacting mediator of cell death
Bmi1	B lymphoma Mo-MLV insertion region 1
Bromphenolblau	Tetrabromphenolsulfonphthalein
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CDK	cyclin-dependent kinase (Zyclin-abhängige Kinase)
CDKI	cyclin-dependent kinase inhibitor (Zyclin-abhängige Kinase-Inhibitor)
cDNA	copy DNA
CK1	casein kinase 1 (Kaseinkinase 1)
CMV	Cytomegalovirus
CS	Kälberserum
CS	citrate synthase (Zitratsynthase)
C-Terminus	Carboxy-Terminus
Δ	Deletion, deletiert
DB	DNA-Bindungsdomäne
DDB1	damage-specific DNA-binding protein
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIM-D	Dimerisierungsdomäne
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid

---

dn	dominant-negativ
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-BD	DNA-Bindungsdomäne
DNMTs	DNA-Methyltransferasen
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphate
DP-1	DRTF1-Polypeptid-1
DR	death receptor (Todesrezeptor)
dREAM	Drosophila RBF, E2F, and Myb-interacting proteins
DRTF1	differentiation-regulated transcription factor 1
DTT	Dithiothreitol
DYRK	dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase
E	Glutaminsäure
E(Z)	Enhancer of Zeste
E1A	Early region 1A
E2F	E2 promotor binding factor
EB	Elutionspuffer
ECL	enhanced chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ER	Estrogen Rezeptor (Östrogenrezeptor)
Esc	Extra sex combs
et al.	und andere
FACS	fluorescence activated cell sorting (Durchflusszytometrie)
FasL	Fas-Ligand
FBS	fetales Rinderserum
Fox	Forkhead-Box
FRE	Forkhead-responsive element (Forkhead-Bindungsstelle)
g	Gramm
GADD45a	growth arrest and DNA damage response gene
GFP	green fluorescent protein
H3K27me <sup>3</sup>	Trimethylierung von Lysin 27 des Histons H3
H3K9me <sup>3</sup>	Trimethylierung von Lysin 9 des Histons H3
HBS	HEPES buffered saline (HEPES-gepufferte Salzlösung)
HCl	Salzsäure
HDACs	Histondeacetylasen
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HOX-Gene	Homöobox-Gene
HPC1/2/3	humane Orthologe zum Pc in <i>Drosophila melanogaster</i>
HPH1/2/3	humane Orthologe zum Ph in <i>Drosophila melanogaster</i>
HRP	horseradish peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
HSCs	hämatopoetische Stammzellen

---

Hsp90	Hitzeschockprotein 90
HT-Motiv	Helix-Turn-Motiv
IKK $\beta$	Inhibitor of NF- $\kappa$ B kinase $\beta$ (Kinase des Inhibitors von NF- $\kappa$ B $\beta$ )
JNK	Jun N-terminal kinase (Jun N-terminale Kinase)
K	Lysin
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dikaliumhydrogenphosphat
K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	Kaliumhexacyanoferrat(III)
K <sub>4</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	Kaliumhexacyanoferrat(II)
kb	Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid
KES	Kernexportsignal
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
KLS	Kernlokalisierungssignal
L	Leucin
l	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
M	Methionin
m	milli
M	Molar
MAPKAPK3	MAPK-activated protein kinase 3 (MAPK-aktivierte Proteinkinase 3)
MEF	Mausembryofibroblasten
MEM	minimal essential medium
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
MLL	mixed-lineage leukemia
M-MLV	Moloney Murine Leukemia Virus
MnSOD	Mangansuperoxiddismutase
mRNA	messenger RNA
mut	mutiert
n	nano
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NGF- $\beta$	Nerve Growth Factor- $\beta$ (Nervenwachstumsfaktor- $\beta$ )
nm	Nanometer
NP40	Nonidet P-40
N-Terminus	Amino-Terminus
ONPG	o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid
P	Prolin
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese

---

PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase (Poly-ADP-Ribose-Polymerase)
PBS	phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
Pc	Polycomb
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCR	polymerase chain reaction
PDK	Phosphoinositide-dependent kinase (Phosphoinositid-abhängige Kinase)
PEPCK	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
PEST-D	PEST-Domäne
Ph	Polyhomeotic
PHX	Phoenix-Zellen
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol-1,4,5-triphosphat
PKB	Proteinkinase B
PP-BD	Pocketproteinbindungsdomäne
pRB	Retinoblastomprotein
PRC1	Polycomb Repressive Complex 1
PRC2	Polycomb Repressive Complex 2
PREs	Polycomb responsive elements
PS	Pferdeserum
Psc	Posterior sex combs
PTEN	phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten
PVDF	Polyvinylidendifluorid
q	quantitativ
qRT-PCR	quantitative Realtime-PCR (quantitative Echtzeit-PCR)
R	Arginin
RF	Ringfinger
RING1	humanes Ortholog zu Ring in <i>Drosophila melanogaster</i>
Ringerfinger-D	Ringfingerdomäne
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
RNasin	Ribonuklease Inhibitor
ROS	reactive oxygen species (reaktive Sauerstoffverbindungen)
S	Serin
SA-β-Gal	Seneszenz-assoziierte β-Galaktosidase
SAHF	senescence-associated heterochromatic foci (Seneszenz-assoziierte, heterochromatische Fokusse)
Sce	Sex combs extra
SDS	Sodium dodecyl sulphate (Natriumdodecylsulfat)

---

Shh	Sonic hedgehog
shRNA	short hairpin RNA
siRNA	small interfering RNA
SOCS1	suppressor of cytokine signaling 1
sq	semi-quantitativ
SU(Z)12	Suppressor of Zeste 12
T	Threonin
TA-D	Transaktivierungsdomäne
TAE	Tris-Acetat/EDTA
TBS	Tris buffered saline (Tris-gepufferte Salzlösung)
TE	Tris/EDTA
TEMED	N,N,N,N-Tetramethyl-ethylendiamin
TetO	Tet-Operator
TetR	Tet-Repressor
TP53	tumor protein 53
TRAIL	TNF-related apoptosis inducing ligand
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
Triton X-100	Alkylphenylpolyethylenglykol
Tween-20	Polyoxyethylen-sorbitan-monolaurat
u. a.	unter anderem
USP7	Ubiquitin-spezifische Protease 7
UV	Ultraviolett
v/v	volume to volume (Volumen zu Volumen)
w/v	weight per volume (Gewicht zu Volumen)
WB	Western Blot
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktosid
Zyklin A-BD	Zyklin A-Bindungsdomäne
-/- bzw. +/-	homozygote bzw. heterozygote Deletion eines Genabschnittes oder eines gesamten Gens; kodiertes Protein wird nicht oder in trunkierter Weise gebildet

## 8.2 Übersicht der verwendeten Protein- und Genschreibweisen

Die in der Literatur verwendeten Schreibweisen für Proteine und Gene in *Homo sapiens* und *Mus musculus* sind nicht immer einheitlich. Für die vorliegende Arbeit wurde in Anlehnung an die Internetseite des National Centers for Biotechnology Information ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)) und die bei einer Konferenz für FOXOs beschlossene Nomenklatur die in Tabelle 7 aufgelisteten Schreibweisen genutzt (Kaestner et al., 2000).

**Tabelle 7: Zusammenfassung der verwendeten Schreibweisen für Proteine und Gene in *Homo sapiens* und *Mus musculus*.** In Anlehnung an Angaben aus der Literatur und der Internetseite [www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) des National Centers for Biotechnology Information wurden diese Protein- und Genschreibweisen in der vorliegenden Arbeit verwendet (Kaestner et al., 2000). Bei Aussagen genereller Natur wurde die Symbolschreibweise gewählt.

Symbol	<i>Homo sapiens</i>		<i>Mus musculus</i>	
	Protein	Gen	Protein	Gen
BCL-6	BCL-6	<i>BCL-6</i>		
BCL-XL	BCL-XL	<i>BCL-XL</i>		
BIM	BIM	<i>BIM</i>	Bim	<i>Bim</i>
BMI1	BMI1	<i>BMI1</i>	Bmi1	<i>Bmi1</i>
c-Myc	c-MYC	<i>c-MYC</i>	c-Myc	<i>c-Myc</i>
DP-1	DP-1	<i>DP-1</i>	Dp-1	<i>Dp-1</i>
E2F	E2F	<i>E2F</i>	E2f	<i>E2f</i>
FOXO1	FOXO1	<i>FOXO1</i>	Foxo1	<i>Foxo1</i>
FOXO3a	FOXO3a	<i>FOXO3a</i>	Foxo3a	<i>Foxo3a</i>
MEL-18	MEL-18	<i>MEL-18</i>	Mel-18	<i>Mel-18</i>
p16 <sup>INK4A</sup>	p16 <sup>INK4A</sup>	<i>INK4A</i>	p16 <sup>Ink4a</sup>	<i>Ink4a</i>
p19 <sup>ARF</sup>	p14 <sup>ARF</sup>	<i>ARF</i>	p19 <sup>Arf</sup>	<i>Arf</i>
p21CIP1	p21CIP1	<i>CIP1</i>		
p27KIP1	p27KIP1	<i>KIP1</i>		
p53	p53	<i>TP53</i>	p53	<i>Tp53</i>
pRB	pRB	<i>RB</i>	pRb	<i>Rb</i>
TRAIL	TRAIL	<i>TRAIL</i>		
Zyklin A2		<i>CCNA2</i>		<i>Ccna2</i>
Zyklin D2		<i>CCND2</i>		<i>CCND2</i>
Zyklin E1		<i>CCNE1</i>		<i>Ccne1</i>



### 8.3 Ergebnisliste des cDNA-Microarrays von 1A3-Zellen

**Tabelle 8: Gene, deren Expression sich bei Induktion von E2F-1-ER in 1A3-Zellen mindestens 3,5-fach änderte.** 1A3-Zellen wurden für 12 Stunden mit 200 nM 4-OHT oder dem Lösungsmittel Ethanol behandelt, RNA isoliert und für den cDNA-Microarray verwendet. Dabei diente die Probe ohne 4-OHT-Behandlung als Referenz. Die erhaltenen Rohdaten wurden von Birgit Samans ausgewertet. x-fach...x-fache Änderung der Genexpression. Richtung...Genexpression ist bei aktiviertem E2F-1-ER erhöht (hoch) oder erniedrigt (runter) im Vergleich zu 1A3-Zellen, in denen E2F-1-ER nicht aktiviert wurde.

x-fach	Richtung	Symbol	Bezeichnung des Gens
26,3	hoch	ZDHHC23	Zinc finger, DHHC domain containing 23
23,5	hoch	EPB41L4B	Erythrocyte membrane protein band 4.1 like 4B
22,1	runter	SSB	Sjogren syndrome antigen B (autoantigen La)
21,6	hoch	Ells1	Hypothetical protein Ells1
21,4	hoch	CRTAP	Cartilage associated protein
20,7	hoch	RRAGD	Ras-related GTP binding D
19,0	hoch	LMO2	LIM domain only 2 (rhombotin-like 1)
18,8	runter	VMP1	Likely ortholog of rat vacuole membrane protein 1
17,4	hoch	PITPNC1	Phosphatidylinositol transfer protein, cytoplasmic 1
17,3	hoch	ANKH	Ankylosis, progressive homolog (mouse)
15,1	hoch	FLJ30834	Hypothetical protein FLJ30834
13,1	hoch	FOXO1A	Forkhead box O1A (rhabdomyosarcoma)
12,1	hoch	CD83	CD83 antigen (activated B lymphocytes, immunoglobulin superfamily)
11,8	runter	CCL2	Chemokine (C-C motif) ligand 2
11,7	hoch	CaMKIINalpha	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II
10,7	hoch	C9orf140	Chromosome 9 open reading frame 140
10,0	hoch	CCND3	Cyclin D3
9,9	hoch	GNAZ	Guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha z polypeptide
9,3	hoch	MAP3K5	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5
9,2	hoch		CDNA FLJ40165 fis, clone TESTI2015962
9,1	runter	CCL2	Chemokine (C-C motif) ligand 2
9,0	runter	RARB	Retinoic acid receptor, beta
8,7	hoch	DLX4	Distal-less homeobox 4
8,4	hoch	IL17D	Interleukin 17D
8,1	hoch	ABCA5	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 5
8,1	hoch	DKFZP564D166	Putative ankyrin-repeat containing protein
8,0	hoch	GKAP1	G kinase anchoring protein 1
8,0	hoch	MGC8974	Hypothetical protein MGC8974
8,0	hoch	SLC25A29	Solute carrier family 25, member 29
7,9	runter	RHOB	Ras homolog gene family, member B
7,9	hoch	HIP1	Huntingtin interacting protein 1
7,8	runter	MBNL2	Muscleblind-like 2 (Drosophila)
7,7	hoch	RNPC1	RNA-binding region (RNP1, RRM) containing 1
7,6	hoch	ACVR1B	Activin A receptor, type IB
7,5	hoch	BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2
7,4	hoch	GCH1	GTP cyclohydrolase 1 (dopa-responsive dystonia)
7,4	hoch	TLK2	Tousled-like kinase 2

7,3	hoch	IGHG1	Immunoglobulin heavy constant gamma 1 (G1m marker)
7,3	hoch	MYO6	Myosin VI
7,3	hoch	LOC283464	Hypothetical protein LOC283464
7,3	hoch	CAMSAP1	Calmodulin regulated spectrin-associated protein 1
7,3	hoch	CDKN2C	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2C (p18, inhibits CDK4)
7,3	hoch	FOXO3A	Forkhead box O3A
7,2	hoch	AKAP12	A kinase (PRKA) anchor protein (gravin) 12
7,1	hoch	CITED1	Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 1
7,1	hoch	PRKAG1	Protein kinase, AMP-activated, gamma 1 non-catalytic subunit
7,0	hoch	TACC1	Transforming, acidic coiled-coil containing protein 1
7,0	hoch	ELOVL7	ELOVL family member 7, elongation of long chain fatty acids (yeast)
7,0	runter	ZCCHC9	Zinc finger, CCHC domain containing 9
7,0	runter	AF1Q	ALL1-fused gene from chromosome 1q
6,9	hoch	ECE1	Endothelin converting enzyme 1
6,9	hoch	CHKA	Choline kinase alpha
6,8	hoch	LOC157378	Hypothetical protein BC017881
6,8	hoch	LSM11	LSM11, U7 small nuclear RNA associated
6,7	hoch	TEX264	Testis expressed sequence 264
6,7	hoch	GAB1	GRB2-associated binding protein 1
6,6	hoch	FLJ10099	Hypothetical protein FLJ10099
6,6	hoch	FBXL11	F-box and leucine-rich repeat protein 11
6,5	hoch	TM4SF9	Transmembrane 4 superfamily member 9
6,5	hoch		Transcribed locus
6,4	hoch		CDNA: FLJ22256 fis, clone HRC02860
6,4	hoch	KIT	V-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog
6,4	runter	PLK2	Polo-like kinase 2 (Drosophila)
6,3	hoch	AKAP12	A kinase (PRKA) anchor protein (gravin) 12
6,3	hoch	SPAG9	Sperm associated antigen 9
6,3	hoch	GAB1	GRB2-associated binding protein 1
6,2	hoch	SLK	STE20-like kinase (yeast)
6,2	hoch	MLR2	Ligand-dependent corepressor
6,2	runter	MBIP	MAP3K12 binding inhibitory protein 1
6,1	runter	PRAME	Preferentially expressed antigen in melanoma
6,1	hoch	TFAP2A	Transcription factor AP-2 alpha (activating enhancer binding protein 2 alpha)
6,0	runter	TAF1	TAF1 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 250kDa
6,0	hoch	HSH1N1	HIV-1 induced protein HIN-1
5,9	runter	IFI16	Interferon, gamma-inducible protein 16
5,9	hoch	GLUD1	Glutamate dehydrogenase 1
5,8	runter	BTG1	B-cell translocation gene 1, anti-proliferative
5,8	runter	CTGF	Connective tissue growth factor
5,8	hoch	NUDT3	Nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 3

5,7	runter	ZFHX4	Zinc finger homeodomain 4
5,6	hoch	FGFR3	Fibroblast growth factor receptor 3 (achondroplasia, thanatophoric dwarfism)
5,6	hoch	CNKSR2	Connector enhancer of kinase suppressor of Ras 2
5,6	hoch	USP4	Ubiquitin specific protease 4 (proto-oncogene)
5,6	hoch	LPGAT1	Lysophosphatidylglycerol acyltransferase 1
5,5	hoch	ENO2	Enolase 2 (gamma, neuronal)
5,5	hoch	GPR161	G protein-coupled receptor 161
5,5	runter	F2RL2	Coagulation factor II (thrombin) receptor-like 2
5,5	hoch	PRKAB1	Protein kinase, AMP-activated, beta 1 non-catalytic subunit
5,5	hoch	KIAA1450	KIAA1450 protein
5,5	hoch	SHD1	Sac3 homology domain 1 (S. cerevisiae)
5,5	hoch	RYBP	RING1 and YY1 binding protein
5,5	hoch	RRAGD	Ras-related GTP binding D
5,5	hoch	OSBPL6	Oxysterol binding protein-like 6
5,5	runter	PGBD3	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 6
5,5	hoch	KIAA0582	KIAA0582
5,5	hoch	GLUD1	Glutamate dehydrogenase 1
5,5	hoch	T1	Tularik gene 1
5,5	hoch	HNRPU	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U (scaffold attachment factor A)
5,5	runter	CDK6	Cyclin-dependent kinase 6
5,4	hoch	QDPR	Quinoid dihydropteridine reductase
5,4	runter	CENPE	Centromere protein E, 312kDa
5,4	hoch	SSX2IP	Synovial sarcoma, X breakpoint 2 interacting protein
5,4	runter		Transcribed locus
5,4	hoch	RAP2A	RAP2A, member of RAS oncogene family
5,3	hoch		Transcribed locus
5,3	hoch	RNF159	Ring finger protein (C3HC4 type) 159
5,3	hoch	C1orf21	Chromosome 1 open reading frame 21
5,3	hoch	SLC9A3R1	Solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), isoform 3 regulator 1
5,3	hoch	KIAA1522	KIAA1522 protein
5,2	hoch	SLC16A10	Solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 10
5,2	hoch	LOC401321	Hypothetical LOC401321
5,2	hoch	RAB4A	RAB4A, member RAS oncogene family
5,2	runter	CITED2	Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 2
5,2	hoch	RAB9B	RAB9B, member RAS oncogene family
5,1	hoch	C14orf45	Chromosome 14 open reading frame 45
5,1	hoch	EZH2	Enhancer of zeste homolog 2 (Drosophila)
5,1	hoch	MGC35048	Hypothetical protein MGC35048
5,1	hoch	CRY1	Cryptochrome 1 (photolyase-like)
5,1	runter	KCTD10	Potassium channel tetramerisation domain containing 10
5,1	runter	ARL6IP	ADP-ribosylation factor-like 6 interacting protein

5,1	hoch	DLGAP4	Discs, large (Drosophila) homolog-associated protein 4
5,1	hoch	FLJ21963	FLJ21963 protein
5,0	runter	AFAP	Hypothetical protein LOC254848
5,0	hoch	PPP2R5A	Protein phosphatase 2, regulatory subunit B (B56), alpha isoform
5,0	runter		Homo sapiens, clone IMAGE:4698842, mRNA
5,0	runter	FLJ11184	Hypothetical protein FLJ11184
5,0	hoch	DRG1	Developmentally regulated GTP binding protein 1
5,0	hoch	FLJ20701	Hypothetical protein FLJ20701
4,9	hoch		HepG2 partial cDNA, clone hmd1a08m5.
4,9	hoch	PKNOX1	PBX/knotted 1 homeobox 1
4,9	hoch	DSCR1L2	Down syndrome critical region gene 1-like 2
4,8	hoch	MYCL1	V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog 1, lung carcinoma derived (avian)
4,8	hoch	RAB9B	RAB9B, member RAS oncogene family
4,8	runter	CART1	Cartilage paired-class homeoprotein 1
4,8	hoch	PLEKHA1	Pleckstrin homology domain containing, family A (phosphoinositide binding specific) member 1
4,7	hoch	LOC112868	Hypothetical protein LOC112868
4,7	hoch	WDR8	WD repeat domain 8
4,7	hoch	C1orf41	Chromosome 1 open reading frame 41
4,7	runter	CDK7	Cyclin-dependent kinase 7 (MO15 homolog, Xenopus laevis, cdk-activating kinase)
4,7	runter	CSTF3	Hypothetical protein LOC283267
4,7	hoch	CASP3	Caspase 3, apoptosis-related cysteine protease
4,6	hoch	HIPK2	Homeodomain interacting protein kinase 2
4,6	hoch	C1GALT1	Core 1 UDP-galactose:N-acetylgalactosamine-alpha-R beta 1,3-galactosyltransferase
4,5	hoch	HNRPU	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U (scaffold attachment factor A)
4,5	hoch	FVT1	Follicular lymphoma variant translocation 1
4,5	hoch	KMO	Kynurenine 3-monooxygenase (kynurenine 3-hydroxylase)
4,4	runter	PBX1	Pre-B-cell leukemia transcription factor 1
4,4	hoch	ZNRF2	Zinc and ring finger 2
4,4	hoch	BMI1	B lymphoma Mo-MLV insertion region (mouse)
4,4	hoch	MAK3	Mak3 homolog (S. cerevisiae)
4,4	hoch		CDNA FLJ36309 fis, clone THYMU2004986
4,4	hoch	MGC5576	Hypothetical protein MGC5576
4,4	runter	GMRP-1	K <sup>+</sup> channel tetramerization protein
4,4	hoch	SLC25A25	Solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; phosphate carrier), member 25
4,4	hoch	MAP3K1	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1
4,3	hoch	IL1R1	Interleukin 1 receptor, type I
4,3	hoch	SHD1	Sac3 homology domain 1 (S. cerevisiae)
4,3	hoch	MGC34132	Hypothetical protein MGC34132
4,3	runter	WDR26	WD repeat domain 26
4,3	hoch	KIF21B	Kinesin family member 21B
4,3	hoch	MBD4	Methyl-CpG binding domain protein 4

4,3	hoch	CALM1	Calmodulin 1 (phosphorylase kinase, delta)
4,2	hoch	MAK3	Mak3 homolog (S. cerevisiae)
4,2	hoch	OACT2	O-acyltransferase (membrane bound) domain containing 2
4,2	hoch	EML4	Echinoderm microtubule associated protein like 4
4,2	hoch	DYRK2	Dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 2
4,2	hoch	RCOR1	REST corepressor 1
4,2	hoch	NIN	Ninein (GSK3B interacting protein)
4,2	hoch	CBFB	Core-binding factor, beta subunit
4,2	hoch		Transcribed locus
4,1	hoch	DGKZ	Diacylglycerol kinase, zeta 104kDa
4,1	hoch	FGFR1	Fibroblast growth factor receptor 1 (fms-related tyrosine kinase 2, Pfeiffer syndrome)
4,1	hoch	LOC284018	Hypothetical protein LOC284018
4,1	hoch	SIAH2	Seven in absentia homolog 2 (Drosophila)
4,1	hoch	WRB	Tryptophan rich basic protein
4,1	hoch	JJAZ1	Joined to JAZF1
4,1	runter	MOSPD1	Motile sperm domain containing 1
4,1	hoch	PDCD8	Programmed cell death 8 (apoptosis-inducing factor)
4,1	runter	IFRD1	Interferon-related developmental regulator 1
4,1	hoch	SOCS4	Suppressor of cytokine signaling 4
4,1	hoch	KIAA1644	KIAA1644 protein
4,1	hoch	MASA	E-1 enzyme
4,1	runter	CMAH	Cytidine monophosphate-N-acetylneuraminic acid hydroxylase (CMP-N-acetylneuraminate monooxygenase)
4,1	hoch	ATP6V0B	ATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal 21kDa, V0 subunit c"
4,1	hoch		Transcribed locus
4,1	hoch	BMI1	B lymphoma Mo-MLV insertion region (mouse)
4,0	hoch	CARF	Collaborates/cooperates with ARF (alternate reading frame) protein
4,0	hoch		Similar to BMP2 inducible kinase
4,0	hoch	BTG3	BTG family, member 3
4,0	hoch		CDNA FLJ40982 fis, clone UTERU2014601
4,0	runter	DHX36	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 36
4,0	hoch	TRIM33	Tripartite motif-containing 33
4,0	runter	NEO1	Neogenin homolog 1 (chicken)
4,0	hoch	TMEM23	Transmembrane protein 23
4,0	hoch	CDC34	Cell division cycle 34
4,0	hoch	BMI1	B lymphoma Mo-MLV insertion region (mouse)
4,0	hoch	RBMX	RNA binding motif protein, X-linked
4,0	hoch	EGLN1	Egl nine homolog 1 (C. elegans)
4,0	runter	DCTN4	Dynactin 4 (p62)
4,0	hoch	COL21A1	Collagen, type XXI, alpha 1
4,0	hoch	LOC153561	Hypothetical LOC389295
4,0	runter	PC4	Activated RNA polymerase II transcription cofactor 4
3,9	hoch	ZDHHC18	Zinc finger, DHHC domain containing 18
3,9	runter		Transcribed locus

3,9	runter	ARHGEF2	Rho/rac guanine nucleotide exchange factor (GEF) 2
3,9	hoch	KIAA1340	KIAA1340 protein
3,9	hoch	PDK3	Pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 3
3,9	hoch	TMEFF1	Transmembrane protein with EGF-like and two follistatin-like domains 1
3,9	hoch	PXK	PX domain containing serine/threonine kinase
3,9	runter	MAP3K7	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7
3,9	hoch	WBSCR16	Williams-Beuren syndrome chromosome region 16
3,8	hoch	HSPA12A	Heat shock 70kDa protein 12A
3,8	hoch	SLK	STE20-like kinase (yeast)
3,8	hoch	KCNK1	Potassium channel, subfamily K, member 1
3,8	hoch	BTAf1	BTAf1 RNA polymerase II, B-TFIID transcription factor-associated, 170kDa (Mot1 homolog, <i>S. cerevisiae</i> )
3,8	runter	TSNAX	Translin-associated factor X
3,8	runter	WDR42A	WD repeat domain 42A
3,8	hoch		Transcribed locus
3,8	hoch	HSPC159	HSPC159 protein
3,8	hoch	CHPT1	Choline phosphotransferase 1
3,8	hoch	RBBP8	Retinoblastoma binding protein 8
3,8	hoch	BLMH	Bleomycin hydrolase
3,8	runter	DPYD	Dihydropyrimidine dehydrogenase
3,8	hoch	DHX8	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 8
3,8	hoch	ZNF496	Zinc finger protein 496
3,7	runter	CGI-141	CGI-141 protein
3,7	hoch	SRPRB	Signal recognition particle receptor, B subunit
3,7	hoch	FHL1	Four and a half LIM domains 1
3,7	runter	C14orf119	Chromosome 14 open reading frame 119
3,7	hoch	PDXP	Pyridoxal (pyridoxine, vitamin B6) phosphatase
3,7	hoch	YTHDF2	YTH domain family, member 2
3,7	runter	HSPA1L	Heat shock 70kDa protein 1-like
3,7	hoch	LCHN	LCHN protein
3,7	runter		Hypothetical LOC283029
3,7	hoch	VKORC1L1	Vitamin K epoxide reductase complex, subunit 1-like 1
3,7	hoch	CHPT1	Choline phosphotransferase 1
3,7	hoch	FLJ90013	Hypothetical protein FLJ90013
3,7	hoch	ITM2C	Integral membrane protein 2C
3,7	hoch	INPP5F	Inositol polyphosphate-5-phosphatase F
3,7	hoch	FLJ13855	Hypothetical protein FLJ13855
3,7	hoch	TIGD3	Tigger transposable element derived 3
3,6	hoch	TBL1X	Transducin (beta)-like 1X-linked
3,6	runter	GYPC	Glycophorin C (Gerbich blood group)
3,6	hoch	JUND	Jun D proto-oncogene
3,6	hoch	NAPE-PLD	N-acyl-phosphatidylethanolamine-hydrolyzing phospholipase D
3,6	hoch	FLJ14668	Hypothetical protein FLJ14668
3,6	runter	DDR2	Discoidin domain receptor family, member 2
3,6	runter	COPB2	Coatomer protein complex, subunit beta 2 (beta prime)
3,6	hoch		Transcribed locus
3,6	runter	DDR2	Discoidin domain receptor family, member 2

---

3,6	hoch	BBX	Bobby sox homolog (Drosophila)
3,6	runter	ZNF281	Zinc finger protein 281
3,6	runter	LOC115294	Similar to hypothetical protein FLJ10883
3,6	hoch	OSBPL3	Oxysterol binding protein-like 3
3,5	runter		Full-length cDNA clone CS0DF010YE22 of Fetal brain of Homo sapiens (human)
3,5	hoch	TLK2	Tousled-like kinase 2
3,5	runter	MGC2714	Hypothetical protein MGC2714
3,5	hoch	VIL2	Villin 2 (ezrin)
3,5	runter	ARMCX3	Armadillo repeat containing, X-linked 3
3,5	hoch	EED	Embryonic ectoderm development
3,5	hoch	EFNB3	Ephrin-B3
3,5	runter	DAB2	Disabled homolog 2, mitogen-responsive phosphoprotein (Drosophila)

---

## 8.4 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Katrin Nowak  
geboren am 17. Juli 1980 in Görlitz  
ledig

### Schulbildung

September 1987 bis Juli 1992 Polytechnische Oberschule in Görlitz  
August 1992 bis Juli 1999 Gymnasium Königshufen, Görlitz  
Abschluss: Abitur (1,3)

### Hochschulbildung

Oktober 1999 bis Oktober 2001 Grundstudium der Biochemie  
Universität Leipzig  
Abschluss: Vordiplom (1,3)

Oktober 2001 bis März 2004 Hauptstudium der Biochemie  
Universität Leipzig  
Abschluss: Diplom (1,2)

Oktober 2003 bis März 2004 Diplomarbeit auf dem Gebiet der Neurobiologie  
Universität Leipzig  
Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung  
Betreuung: PD Dr. Steffen Rossner  
Thema: „Charakterisierung der YY1-Bindungsstelle  
im Promoter der  $\beta$ -Sekretase BACE1 der Ratte“

seit Mitte Mai 2004 Doktorarbeit  
Philipps-Universität Marburg  
Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung  
Labor von Prof. Dr. Martin Eilers  
Betreuung: PD Dr. Werner Lutz  
Erstgutachter: Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl  
Zweitgutachter: Prof. Dr. Martin Eilers



## 8.5 Danksagung

Ich möchte mich bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein Dank gilt Dr. Werner Lutz für die praktische Betreuung der Doktorarbeit und für die Bereitstellung dieser interessanten Themen und Fragestellungen. Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl danke ich besonders für die Betreuung dieser Promotion sowie für die hilfreichen Anregungen im Thesis Komitee. Bei Prof. Dr. Martin Eilers möchte ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens, für die stets konstruktive Kritik sowie für seine Diskussionsbereitschaft bedanken. Für seine wertvollen Ratschläge im Thesis Komitee danke ich außerdem Prof. Dr. Alexander Brehm.

Großer Dank gilt allen derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppen Lutz, Eilers, Bauer und Gaubatz: durch die angenehme und aufgeschlossene Stimmung hat mir das Arbeiten im Labor großen Spaß bereitet. Für die wertvollen Vorarbeiten möchte ich mich bei Werner Lutz, Christine Gessner, Christoph Kramps, Kornelius Kerl, Daniel Fehr und Katrin Killmer bedanken. Wesentliche praktische Unterstützung und Hilfe im Labor konnte ich stets von Nicole Forster, Barbara Herkert und Anja Feuer erwarten. Bei Nicole Forster möchte ich mich außerdem speziell für das hilfreiche Korrekturlesen bedanken.

Meinem Freund, Tobias Otto, möchte ich besonders für seine Diskussionsbereitschaft zu manchmal ungewöhnlicher Stunde danken. Seine Anregungen und seine Unterstützung trugen sehr zum Vorankommen dieser Promotion bei. Insbesondere meinen Eltern möchte ich für die fortwährende moralische Unterstützung, für ihren Ansporn und ihr großes Interesse am Gelingen dieser Arbeit danken.

Diese Arbeit ist meinen Eltern in Dankbarkeit und Liebe gewidmet.

## 8.6 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich meine Dissertation

**Die Regulation von *BMI1*, *FOXO1* und *FOXO3a*  
durch den Transkriptionsfaktor E2F-1**

unter der Leitung von Herrn PD Dr. Werner Lutz (ehemals Fachbereich Medizin, Philipps-Universität Marburg) selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich angegebenen Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Katrin Nowak

Marburg, den